

4° Congresso Regionale SIBioC - Sezione Sicilia

## Genomica e proteomica: realtà e prospettive nell'applicazione diagnostica

Catania, 24-26 ottobre 2007

### Presidenti

*Prof. Marcello Ciaccio - Prof.ssa Marcella Renis*

### Presidenti Onorari

*Prof.ssa Anna Maria Giuffrida Stella - Prof. Salvatore Macaione*

### Comitato Scientifico

*Dott. Francesco Amato (Palermo) - Prof. Vincenza Barresi (Catania)*

*Dott. Ignazio Brusca (Palermo) - Prof. Vittorio Calabrese (Catania)*

*Prof. Marcello Ciaccio (Palermo) - Prof. Daniele Condorelli (Catania)*

*Dott. Giuseppe Falliti (Messina) - Dott. Franco Ferrara (Agrigento)*

*Dott. Francesco Gervasi (Palermo) - Prof. Riccardo Ientile (Messina)*

*Dott.ssa Maria Mangano (Catania) - Prof. Stefano Miccichè (Palermo)*

*Dott. Paolo Mingoia (Caltanissetta) - Prof. Giuseppe Nicoletti (Catania)*

*Dott. Roberto Pace (Enna) - Prof.ssa Marcella Renis (Catania)*

*Prof. Angelo Vanella (Catania)*

### Comitato Organizzatore

*Prof. Marcello Ciaccio (Presidente) - Prof.ssa Marcella Renis (Presidente)*

*Prof.ssa Vincenza Barresi - Prof. Vittorio Calabrese*

*Dott. Salvatore Grasso - Dott.ssa Maria Mangano*

*Dott. Roberto Pace - Dott. Christian Scifo*

*Dott.ssa Barbara Tomasello - Sig. Giuseppe Malfa - Sig. Alessandro Visconti*

### Segreteria Scientifica

*Dott. Salvatore Grasso - Dott.ssa Eleonora Guaiano*

*Dott.ssa Maria Sapienza - Dott. Christian Scifo - Dott.ssa Barbara Tomasello*

### Con il Patrocinio

*Ministero della Salute, Università degli Studi di Catania, Facoltà di Medicina e Chirurgia di Catania*

*A.O. Universitaria Policlinico "Gaspare Rodolico" Catania, Facoltà di Farmacia di Catania*

*Ordine dei Farmacisti della Provincia di Catania, Presidenza della Regione Sicilia*

*Assessorato Regionale Sanità, Presidenza dell'Assemblea Regionale Siciliana*

*Provincia Regionale di Catania, Comune di Catania*

*Nota dell'Editore:*

*i riassunti sono stati riprodotti senza alcuna revisione editoriale dal materiale direttamente fornito dagli autori.*

**PRACTICAL APPLICATIONS OF PHARMACOGENETICS:  
A NEW FIELD IN LABORATORY MEDICINE**L. Sacchetti<sup>1</sup>, M. Toriello<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche e CE.IN.GE. Biotecnologie Avanzate S.C.arl-Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli, Italy*

The large number of drugs now available has undoubtedly benefited many patients; however, not all patients respond to a given therapy. Treatment failure has been attributed to variety of factors (poor tolerability, inefficacy, etc.), which raises the question: can these factors be foreseen and prevented? Another important issue is the financial burden of adverse drug reactions. The costs to the UK National Health Service between November 2001 and April 2002 were estimated to be GBP 466 (Blenkinsopp M et al. *Br J Clin Pharmacol* 63: 148-56, 2006), and to represent the fourth cause of mortality in the USA (Lazarou J et al. *JAMA* 13:1200-5, 1998).

Drugs and their dosages are still often selected empirically. Pharmacogenetics, which is concerned with the variability of the response to a drug due to hereditary genetic factors in individuals or in the population, can provide indications about the most effective drug and dose for a given patient. A large body of pharmacogenetic data is now available about the metabolism of therapeutic agents by the cytochrome P450 (CYP 450) family of liver enzymes (Kirchheiner J et al. *Biochim Biophys Acta* 1770: 489-94, 2007). These occur in various allelic variants, some of which are associated with reduced activity and hence reduced metabolism of drugs. Cases in point are the metabolism of tricyclic antidepressants by CYP2D6, of the anticoagulant warfarin by CYP2C9 and of anti-epileptic drugs by CYP3A4. At present, we routinely genotype CYP2C9 using Taqman methodology (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) (Toriello M. et al. *Clin Chem Lab Med* 44:285-7, 2006). There are three clinically important allelic variants of CYP2C9: CYP2C9\*1, CYP2C9\*2, CYP2C9\*3. CYP2C9\*1 is the wild type, whereas CYP2C9\*2 and \*3 are associated with a reduced enzymatic activity of 12% and 5% respectively versus the wild-type allele (Lee C.R. et al. *Pharmacogenetics* 12:251-63, 2002). The CYP3A4 gene is found in over 20 allelic variants and the enzyme is involved in the metabolism of about half the drugs used today, including acetaminophen, codeine, cyclosporin A, diazepam and erythromycin. The enzyme also metabolizes some steroids and carcinogens (Gardiner S et al. *Pharmacol Rev* 58:521-90, 2006, Li A.P. et al. *Toxicology* 104:1-8, 1995). CYP2D6 is responsible for the metabolism of tricyclic antidepressants, antipsychotic drugs, beta adrenergic-blocking agents, and antiarrhythmic drugs. There are 63 different variants of the CYP2D6 gene in different populations.

Recently, 29 single nucleotide polymorphisms of CYP2D6 and two single nucleotide polymorphisms of CYP2C19 were simultaneously genotyped with the Roche Amplichip CYP450 gene chip (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) (Thompson et al *Am J Health Syst Pharm* 63:122, 2006). However, the procedure is too costly for routine use. Other pharmacogenetic methodologies are: PCR-RFLP, Real-Time PCR (LightCycler, TaqMan), mass spectrometry, dHPLC, and direct sequencing (Aquilante

C.L. et al. *Am J Health Syst Pharm* 63: 2101-10, 2006) In conclusion, a wider application of pharmacogenetic tests could lead to more effective customized treatment, although, at present, the cost of some procedures may preclude their routine use. Lastly, in the long-term, pharmacogenetic studies could provide relevant statistical data about the reduction of adverse drug reactions, and consequently lead to a decrease in public health costs.

**MOLECULAR DIAGNOSTICS OF THROMBOPHILIA**

C. Bellia<sup>1</sup>, G. Bivona<sup>1</sup>, M. Ciaccio<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Chair of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Palermo, Italy*

Thrombosis may occur in arteries and in veins. The obstructive clot formation that defines thrombosis is the end product of an imbalance of procoagulant, anticoagulant and fibrinolytic factors. Arterial thrombosis is seen predominantly as myocardial infarction and ischemic stroke, and more rarely in other locations. Although its symptoms are acute due to the blocking of the vital blood flow to an organ, arterial thrombosis could be seen as a chronic disorder related to a slowly increasing severity of atherosclerosis. Venous thrombosis contrasts with this, since the development of the clot is a relatively sudden phenomenon that does not follow a build-up of disease but often occurs in reaction to an acute and shortlasting risk. The most common forms of venous thrombosis are deep vein thrombosis of the leg and pulmonary embolism, although it also occurs in other veins (upper extremities, liver, cerebral sinus, retina, mesenteric), but rarely. It has been shown that carriers of thrombophilic defects who come from thrombophilic families have a more severe phenotype and a younger age-at-onset than individuals with the same defects who do not come from such families. Thrombophilic families harbor more than one genetic defect, including unknown ones that may epistatically interact with the deficiency of a coagulation inhibitor, yielding a higher risk of thrombosis.

Certain genetic variants associated with abnormal haemostasis substantially increase the risk of venous thromboembolism in carriers because of defined biochemical alterations caused by the polymorphisms. For example, the G1691A polymorphism of the factor V gene (factor V Leiden) enhances activated protein C resistance, and is associated with an approximately three-fold increase in risk of venous thromboembolism in heterozygotes and a greater than ten-fold increase in risk in homozygotes (Lane DA, Blood 2000). By contrast, investigations of such haemostatic gene variants in arterial disease, most notably coronary disease, have generally indicated much weaker associations in a large number of apparently conflicting and inconclusive reports. In a recent meta-analysis of 17,000 patients with coronary, cerebrovascular, or peripheral vascular events, it has been observed that the 3 common gene anomalies associated with venous thromboembolism (factor V Leiden mutation, prothrombin G20210A mutation, and MTHFR C677T mutation) increase the risk of arterial thrombotic events to comparatively modest degree (Kim RJ, Am Heart J 2003). More recently, a meta-analysis of 191 studies, involving a total of 66 155 cases and 91 307 controls (counting every study's cases and controls only once), provides the assessment of the relevance to coronary disease of seven haemostatic gene polymorphisms (Ye Z et al, Lancet 2006). It provides the indication of moderate significant associations of coronary disease risk with the 1691A variant of the factor V gene (factor V Leiden) and with the 20210A variant of the prothrombin gene, both of which increase circulating thrombin generation. The findings of the meta-analysis also indicate a weakly positive association of the [-675]

4G variant of the PAI-1 gene with the risk of coronary disease.

Soma authors supposed that the conflicting results or the borderline statistical significance can be explained not only by inadequate sample sizes of the majority of the studies performed but also by the confounding effect of atherosclerosis, which is highly prevalent in middle-aged and elderly patients. When acute myocardial infarction occurs in the young, there is usually less coronary atherosclerosis, and the prevalence of normal or near-normal coronary angiograms is high. It is therefore biologically plausible that changes in hemostasis factors leading to prothrombotic phenotypes of hypercoagulability, heightened platelet function, hypofibrinolysis, and hyperhomocystinemia (as well as their genetic determinants) play a relevant role in younger patients with myocardial infarction (French JK, et al. Am Heart J 2003; Kim RJ, Am Heart J 2003). Moreover, some evidences (Pezzini A et al. Stroke 2005) suggest a gene dose effect of factor V Leiden, G20210A factor II, C677T MTHFR and ApoE polymorphisms on the risk of cerebral ischemia in young adults and a potential interaction of these genetic factors with conventional predisposing conditions, prompting to hypothesize a synergistic combination on the risk of stroke.

### CLINICAL APPLICATIONS OF PROTON SPECTROSCOPY IN THE STUDY OF NEURODEGENERATIVE DISEASE

G. Bivona<sup>1</sup>, S. Latteri<sup>1</sup>, C. Bellia<sup>1</sup>, M. Ciaccio<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Chair of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Palermo

The term neurodegenerative diseases refers to a large, clinically and pathologically heterogeneous entity which encompasses all neurological disorders leading to dysfunction and finally death of subsets of neurons in specific functional anatomical systems. The most common neurodegenerative diseases of the brain are Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD), dementia with Lewy bodies, Huntington disease and amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Increasing age is the single, most consistent risk factor for the development of neurodegenerative diseases and hence their incidence and socio-economic impact are expected to grow with increasing life expectancy in developed countries.

To better define the stage of disease and to assess treatment benefits related to different drugs there is an increasing need to complement clinical outcome markers with objective and quantifiable outcome markers. Neuroimaging methods, particularly MRI, present the ability to replace clinical outcome measures for the assessment of clinical features and Proton Spectroscopy allows for the non-invasive measurement of different markers of neuronal and glial metabolism and function. Depending on the nucleus, different metabolic aspects can be assessed; the most prominent peak of the 1H spectrum belongs to N-acetylaspartate (NAA). Because under normal conditions NAA is exclusively synthesized in the mitochondria of neurons, it is considered to be a marker of neuronal density and integrity. Other peaks in the 1H spectrum belong to creatine/phosphocreatine (Cr), markers for energy metabolism; the glutamate–glutamine complex; the choline-containing compounds (Cho), which are markers for cell membrane metabolism; remaining peaks are represented by myo-inositol. Owing to its properties, NAA seems particularly suited to detect neurodegenerative processes even at early stages and therefore could theoretically be used to monitor effects of a neuroprotective treatment.

Relating to clinical application of 1H MRS in the study of Alzheimer disease, the technique has been demonstrated to be highly specific and sensitive to the diagnosis of Alzheimer's disease. MRS results are expressed in NAA, Cho, and ml to Cr ratios using single voxel short echo (TE = 35 ms) proton spectroscopy in different localization including hippocampus, parietal lobe and the posterior cingulate gyrus. As shown by previous works MRS can be incorporated into the standard work-up for AD and its diagnostic power can be used to impact upon patient management and treatment (Martinez MC et al. in: European Journal of Neurology, 2004).

### PREVENZIONE DEL CERVICO-CARCINOMA: RICERCA/TIPIZZAZIONE VIRUS PAPILOMA (HPV)

S. F. Garozzo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Assegnista UOC Pat.Clin., PO Garibaldi Centro, Catania

Il virus del papilloma (HPV) rappresenta uno dei principali cofattori per lo sviluppo della patologia neoplastica della cervice uterina ed è stato identificato nella quasi totalità dei casi di tumore invasivo. Una volta infettata le cellule dell'epitelio basale il destino del virus può subire diverse evoluzioni: rimanere silente in forma episomiale all'interno della cellula ospite, indurre attraverso la propria replicazione la proliferazione dell'epitelio squamoso e produrre forme vegetative (condilomi) o integrarsi nel genoma della cellula inducendo con maggior frequenza lesioni di grado elevato. In base al potenziale oncogeno dei singoli tipi, gli HPV sono convenzionalmente suddivisi in 3 gruppi: a basso rischio di trasformazione (condilomi) HPV 6,11,44,53-55,26,32,42,61,62,81-84,64,34,73,66,67,69,70,40,57; a rischio intermedio HPV 3,39,41,51,52,56,58,59,68 ed a rischio elevato, identificati in più dell'80% nei carcinomi della cervice: HPV 16 (nel 50%) 18,31,33,45. Il DNA di HPV è stato rilevato in più del 95% delle lesioni intraepiteliali di alto grado (High grade Squamous Intraepithelial Lesions: HSIL) e dei carcinomi invasivi, essendo il tipo 16 più frequente nel carcinoma spinocellulare e il 18 negli adenocarcinomi(1). Dal punto di vista molecolare l'HPV è un virus relativamente piccolo di 55 nm di diametro. Ha un capsidico icosaedrico composto da 72 capsomeri e contenente approssimativamente 7900 paia di basi (bp)(2). Il genoma è funzionalmente distinto in 3 regioni: regione non codificante, regione precoce e regione tardiva(3). Alla diagnosi di infezione da HPV si può giungere attraverso più metodiche: Diagnosi clinica, Pap-test e Colposcopia, Immunoistochimica. Nuovi approcci metodologici nella diagnostica dell'HPV sono basati sull'utilizzo delle tecniche di Biologia Molecolare: Southern blot, Ibridazione in situ, Ibridazione in soluzione (Hybrid Capture), e Linear Array® HPV test. Quest'ultimo, identifica ben 37 genotipi di HPV in campioni genitali per citologia liquida. Dopo estrazione ed amplificazione delle sequenze HPV DNA mediante primer biotinilati specifici, la genotipizzazione del virus viene eseguita con un'ibridazione dell'amplificato con sonde genotipo-specifiche, adese alla strip di nylon, seguita dall'ibridazione degli ampliconi biotinilati con il coniugato streptoavidina-perossidasi, permettendo una semplice identificazione dei genotipi presenti grazie al confronto con la guida di riferimento (4). Ci si prefigge un confronto tra diverse metodiche biomolecolari. Linear Array® HPV test è un metodo accurato ed efficace per screening e prevenzione del cancro cervicale.

#### Bibliografia

1. <http://www.digene.it/documenti/interventi/lillo.pdf>
2. Bernard HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. J Clin Virol 2005;32S:S1-6.
3. Broker TR. Structure and genetic expression of papillomaviruses. Obstet Gynecol Clin North Amer 1987;4:329-48.
4. [http://www.roche-diagnostics.it/Info\\_Salute/HPV/Test\\_diagnostici](http://www.roche-diagnostics.it/Info_Salute/HPV/Test_diagnostici)

**RAGE E MALATTIE NEURODEGENERATIVE**V. Macaione<sup>1</sup><sup>1</sup>Dip. di Scienze Biochimiche, Fisiologiche e della Nutrizione, Università di Messina

RAGE (receptor advanced glycation endproducts), un membro della superfamiglia delle immunoglobuline, è un recettore multi-ligando di membrana espresso da neuroni, microglia, astrociti, cellule endoteliali cerebrali, periciti, e cellule della muscolatura liscia. Un' aumentata espressione di RAGE è stata riscontrata in diverse condizioni patologiche, come diabete, morbo di Alzheimer, neuropatia amiloide, distrofia muscolare facio-scapolo-omeroale e diverse patologie di natura infiammatoria. Il legame dei differenti ligandi con RAGE non accelera la loro degradazione ma dà inizio ad un prolungato periodo di attivazione cellulare mediata da vie di segnale recettore-dipendenti che coinvolgono molecole come erk 1/2 (p44/p42) MAP chinasi, p38 e SAPK/JNK MAP chinasi, rho GTPasi, fosfoinositol-3 chinasi, JAK/STAT e NF-kB.

Tra i ligandi per RAGE nel morbo di Alzheimer troviamo la beta-amiloide, di cui RAGE è il principale trasportatore dalla circolazione sistemica all'interno del cervello. Le conseguenze dell'interazione RAGE-beta-amiloide includono una perturbazione delle proprietà e funzioni dei neuroni, un'amplificazione della risposta gliale, aumento dello stress ossidativo, disfunzioni vascolari e induzione di autoanticorpi.

Appare chiaro come interventi mirati a bloccare l'attivazione di RAGE potrebbero rappresentare un contributo terapeutico incisivo nella cura di diverse malattie neurodegenerative.

**Bibliografia**

1. Donahue JE, Flaherty SL, Johanson CE, et al. RAGE, LRP-1, and amyloid-beta protein in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 2006;112:405-415.
2. Monteiro FA, Sousa MM, Cardoso I, et al. Activation of ERK1/2 MAP kinases in familial amyloidotic polyneuropathy. *J Neurochem* 2006;97:151-161.
3. Macaione V, Aguenouz M, Rodolico C, et al. RAGE-NF-kB pathway activation in response to oxidative stress in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Acta Neurol Scand* 2007;115:115-121.

**DIFFERENTIAL PROTEOMICS IN MOLECULAR MEDICINE**M. Ruopolo<sup>1</sup><sup>1</sup>Dip. di Biochimica e Biotecnologie Mediche, CEINGE-Biotecnologie Avanzate, Università degli Studi di Napoli "Federico II"

The term 'proteome' was coined in 1994 by Marc Wilkins at a conference on the genome and protein maps in Siena. So far, the study of the proteome, designated 'proteomics', has been a very demanding task. Bidimensional gel is the cornerstone of proteomics. It is routinely used for the parallel quantitative expression profiling of large sets of complex protein mixtures to compare two states. Up- or down-regulated proteins are then identified from the molecular mass of their peptides as determined by mass spectrometry.

Differential gel electrophoresis (DIGE) has successfully been used for differential proteomic study in molecular medicine.

The protein lysate samples are labeled in vitro with two fluorescent cyanine minimal dyes (Cy3 and Cy5, respectively) that differ in their excitation and emission wavelengths, mixed, submitted to isoelectrofocusing and separated on a single 2DE SDS-PAGE. After consecutive excitation of both wavelengths, the images are overlaid and subtracted ('normalised'); hence, only differences (e.g. up- or down-regulated proteins) between the two samples are visualised.

A mixture of the samples labeled with a third cyanine dye (Cy2) serves as internal standard.

We used DIGE analysis to characterize proteins that are involved in the mechanisms underlying resistance to imatinib mesylate. Imatinib mesylate is a potent inhibitor of BCR-ABL tyrosine kinase that is implicated in the development of chronic myeloid leukemia (CML).

1A major concern in the treatment of CML is the emergence of resistance to imatinib.

We characterized proteins which are differently expressed in imatinib-resistant and sensible cell line (KCL22-r and KCL22-s).

By using DIGE analysis we identified about eighty differentially expressed proteins. We focused our attention on three down-regulated proteins in KCL22-r: HSP70, HSP27 and Annexin A1. Microarray analysis correlates with proteomics data for the genes that encode HSP70, HSP27 and Annexin A1. We confirmed the down-regulation of HSP70, HSP27 and Annexin A1 in resistant cells by western blotting. Additional western blot experiments suggested that the down-regulation of HSP70 could be related to the down-regulation of heat-shock transcription factor-1 (HSF-1).

On the other hand, Annexin A1 was shown to regulate the endosomal EGFR trafficking 2 and to be involved in mechanisms of resistance to different drugs used in chemotherapy 3.

We are currently investigating the potential involvement of these proteins in the imatinib resistance.

**References**

1. Ren R, *Nature Reviews* 2005;5:172-83.
2. Radke S et al., *FEBS* 2004;578:95-8.
3. Wang Y et al., *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004;314:565-70.

**GENETICS OF NEURODEGENERATIVE DISEASES**M. Zappia<sup>1</sup><sup>1</sup>Università di Catania

Neurodegenerative diseases afflict about 3% of the population. Alzheimer's disease (AD) and Parkinson's disease (PD) account for the great majority of patients suffering from neurodegenerative diseases, but also other conditions should be considered, such as Fronto-Temporal Dementia (FTD), Dementia with Lewy Bodies (DLB), Progressive Supranuclear Palsy (PSP), Cortico-Basal Degeneration (CBD), Multiple System Atrophy (MSA), Huntington's disease (HD), Spino-Cerebellar Ataxias (SCA) and prion diseases.

In less than 5% of cases AD is inherited in an autosomal dominant manner with almost complete penetrance. The Familial AD (FAD) is associated with mutations in three genes: b-amyloid precursor protein (APP), presenilin 1 (PS-1), and presenilin 2 (PS-2). The gene coding for apolipoprotein E (ApoE) exists in three allelic forms and subjects carrying the e4 allele are at risk for AD. Moreover, other genes such as the alpha-2 macroglobulin (A2M) gene and the Myeloperoxidase (MPO) gene, both involved into the degradation of beta-amyloid, are of peculiar interest, because their genomic interactions produce the highest risk for AD reported to date.

In the past years, eleven loci (referred to as PARK1 to PARK11) have been shown to be associated with inherited forms of PD or parkinsonism. They include seven autosomal dominant (PARK1, 3-5, 8, 10 and 11) and four recessive forms (PARK2, 6, 7, and 9). The dominant forms of PD appear to be very rare, while recessively inherited PD occurs much more frequently. Abnormal protein aggregation (alpha-synuclein), dysfunction of the ubiquitine proteasome protein degradation pathway (Parkin and UCHL-1), oxidative stress (DJ-1), mitochondrial dysfunction (Pink-1) and kinase activity (LRRK2) are involved in the pathogenesis of the disease. Moreover, polymorphic variants of various candidate genes, such as those coding for products involved into dopamine metabolism, dopamine receptors, bio-transformation of various chemicals, etc., have been studied in PD. Different results have been obtained, but to date no definitive conclusions about the relevance of these genes into the pathogenesis of PD could be drawn from these studies.

In other conditions, such as FTD, PSP and CBD, the microtubule associated protein tau (MAP-tau) gene on chromosome 17q21 has been reported to be involved in their pathogenesis.

Expansion of a CAG repeat in the coding sequences of genes that elongate a polyglutamine tract in the corresponding proteins have been reported in different disorders: spinal and bulbar muscular atrophy, HD, SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, and SCA17.

**ROLE OF GLUTAMATE METABOTROPIC RECEPTORS (mGluRs) IN SPINAL MOTOR NEURON DEGENERATION**M. V. Catania<sup>1</sup><sup>1</sup>Institute of Neurological Sciences, National Research Council (CNR), Catania

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative disorder, characterized by progressive loss of motor neurons (MNs) and significant astrogliosis. ALS pathogenesis is thought to be multifactorial and likely involves AMPA/kainate receptor-mediated calcium influx and excitotoxicity. An altered cross-talk between glial and neuronal cells might also be crucial for the pathogenesis of ALS. Metabotropic glutamate receptors (mGluRs) modulate excitotoxicity in several experimental paradigms, but their role in MN degeneration has not been extensively investigated. We have reported that group-I (mGluR1 and mGluR5) and -II (mGluR2 and mGluR3) metabotropic glutamate receptors (mGluRs) are over-expressed in reactive astrocytes of spinal cords from ALS patients (Aronica et al., *Neuroscience* 2001,105:2, 509-520) and have recently confirmed these results in the G93A mouse model of ALS, suggesting that mGlu receptors located on glial cells may play a role in the pathogenesis or progression of ALS.

In the present study we investigated the role of mGluRs on MN degeneration. To this aim, we carried out excitotoxicity experiments in mixed spinal cord cultures pre-treated with group-I and group-II antagonists for three days. Exposure of cultures to AMPA (50 uM) for 15 minutes at 14-15 days in vitro (DIV) resulted in about 50% MN death, as assessed on the following day by counting surviving MNs. A pretreatment from DIV 11 to 14 with the mGluR5 antagonist MPEP (3 uM), but not with the mGluR1 antagonist CPCCOEt (10 uM) or the mGluR2/3 antagonist LY341495 (10 nM) significantly reduced AMPA-toxicity. Double-labelling immunocytochemistry and Western blotting analysis revealed the presence of mGluR5 in MNs and pure cultured spinal cord astrocytes, respectively. Thus, a chronic treatment with MPEP can have a direct effect on MNs and/or modulate the astrocytic release of factors indirectly affecting AMPA-mediated MN degeneration.

## RUOLO DEL LABORATORIO E ASPETTI DI VALUTAZIONE DEL DATO NELLA DIAGNOSTICA IN URGENZA

C. Locatelli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Antiveleni Pavia e Centro Naz. di Informazione Tossicologica, Servizio Tossicologia, IRCCS Fond. Maugeri, Pavia

L'intossicazione acuta rappresenta un evento di sempre più frequente riscontro per chi opera nei servizi e dipartimenti di urgenza ed emergenza (DEA), con un'incidenza variabile in base alle caratteristiche del bacino d'utenza. La formazione specifica in tossicologia clinica, unitamente alla disponibilità di strumenti diagnostici e terapeutici specifici sono pertanto elementi essenziali per i medici che operano nell'area dell'urgenza [1]. Il supporto analitico adeguato per una diagnostica tossicologica approfondita, tuttavia, è poco disponibile nella maggior parte dei DEA, se non ove sono presenti reparti di cura di tossicologia clinica e Centri antiveleni.

Le usuali analisi di biochimica clinica d'urgenza possono fornire, con indicazioni e interpretazioni specifiche nel singolo caso, utili informazioni per la diagnosi delle intossicazioni. È evidente che sensibilità, specificità e appropriatezza di diagnosi e di trattamento possono però spesso dipendere dalla disponibilità di test specifici di tossicologia analitica (TT). Di fatto, questi costituiscono nell'urgenza un utile e importante supporto all'anamnesi, all'esame obiettivo e alla consulenza tossicologica fornita da un Centro antiveleni: risultano essenziali nella conferma del sospetto diagnostico (specie in caso di veleni lesionali), per la corretta applicazione di alcune terapie antidotiche e di tecniche di depurazione, nonché per la diagnosi differenziale di quadri clinici aspecifici.

I TT possono essere di tipo qualitativo, semiquantitativo o quantitativo; ogni metodica ha campi di applicazione e tempi di risposta diversi, affidabilità e accuratezza variabili, e richiede competenze analitiche più o meno specifiche, con notevole differenza nei costi.

Requisito fondamentale del TT è la capacità di fornire in tempo reale e con elevato livello di affidabilità il risultato analitico concernente il più vasto spettro possibile di sostanze. Ciò si contrappone ad alcune note difficoltà, fra le quali il numero elevato di sostanze disponibili, la loro diversificata struttura chimica, la continua immissione nel mercato di nuove molecole, le interferenze dovute a co-assunzioni di molecole diverse, l'ampio intervallo delle dosi efficaci e delle concentrazioni raggiungibili nei liquidi biologici. A questo si aggiunge, sul piano gestionale e organizzativo, l'imprevedibilità e irregolarità numerica e temporale con cui i casi si presentano, nonché le possibili implicazioni medicolegali ad essi sottese.

## SELDI-TOF APPROACH FOR CANCER BIOMARKER DISCOVERY

I. Bongarzone<sup>1</sup>, M. Cremona<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. di Proteomica del Dip. Sperimentale e Laboratori, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale Tumori, Milano

Nowdays, cancer identification using biomarkers is based on individually proteins, which is not always trustworthy. The reason is that most of the biomarkers have low or at least questionable specificity. An example could be prostate specific antigen (PSA), biomarker that is used for prostate cancer detection. The problem of this biomarker is that PSA varies in specificity and sensitivity, so false positives and negatives are commonly detected. These problems are then combined with the lack of biomarkers for early cancer detection.

Proteomics has enormous potential to detect biomarkers of early cancer states, to monitor disease progression and efficacy of drug action. Human fluids, serum and plasma in particular, are advisable sources to search for cancer biomarkers due to their cost, little invasiveness, easy sample collection and processing. In the case of cancer, altered protein expression profiles in serum/plasma emanating from the tissue constitute molecular signatures or "cancer fingerprints" that reflects the perturbation of cellular/tissue networks. Remarkably, these signatures should be specific for the different types of cancer. However, alterations of protein expression profiles, especially in early state of cancer, could be also due to immuno-inflammatory host response and in this case changes in protein profiles are markedly dynamic and less cancer-type specific.

Due to high dynamic range of protein abundances in serum/plasma ( $\sim 10^{10}$ ) and relatively low dynamic range of detection of current proteomics technologies ( $\sim 10^5$ ), various prefractionation technologies are needed to enhance the ability to detect low abundance and potentially new circulating cancer marker proteins. The discovery, identification, and validation of cancer-associated serum/plasma proteins/peptides is a difficult task, which also requires hundreds, if not thousands, of samples to be analysed. Recently, a SELDI-TOF based proteomic approach has been used to detect ovarian cancer in its early stages with remarkable sensitivity and specificity. These researchers developed a bioinformatics tool and used it to identify proteomic patterns in serum to distinguish neoplastic from non-neoplastic disease within the ovary (Petricoin et al., 2002). Since this initial report, this methodology has been applied to other types of cancer including prostate and breast cancer (Wulfkuhle et al., 2003).

Although various serum biomarkers have been investigated in lung cancer diagnosis, none has proven useful in general clinical practice, primarily because of limited sensitivity and specificity. The goal of our study is to identify a proteomic signature directly obtained from purified plasma to distinguish lung cancer cases from matched controls with an easy, rapid technology based on SELDI-TOF. Careful attention has been directed to those critical issues of reproducibility and pre-analytical variability in a large number of samples. We analysed proteomic profiles in plasma of subjects with stage I lung cancer vs matched controls. A plasma protein signature

consisting of six peptides was found to be associated with lung cancer. In order to test the clinical utility of the signature we are now testing a blinded test set of plasma from a population of hundreds of heavy smokers collected in the last two years in our Institution and for which we registered functional, radiological data in a data base. Proteomic results and clinical data will be integrated and the effectiveness of the identified proteomic signature in detecting smokers with lung cancer will be evaluated.

#### References

Petricoin EF et al. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 2002;359:572-7.

Wulfkuhle JD et al. Proteomic applications for the early detection of cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3(4):267-75.

#### Review

### **TRANSFERRINA CARBOIDRATO CARENTE (CDT) MARCATORE DI ABUSO ALCOLICO**

A. Signorelli<sup>1</sup>, C. Corsaro<sup>1</sup>, M. A. Mangano<sup>1</sup>, I. Zinno<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*U.O. Chimica Clinica e Tossicologica, Lab. di Sanità Pubblica, A.U.S.L. 3 Catania*

L'abuso alcolico è un importante problema sociale che coinvolge in maniera sempre più diretta il laboratorio e ciò perché negli ultimi nove anni sono aumentati i comportamenti a rischio. La CDT (transferrina carboidrato carente) è il marcatore biochimico più specifico per la determinazione dell'abuso alcolico e per il monitoraggio dell'astinenza durante il trattamento terapeutico in quando il suo utilizzo è applicabile ai soggetti con storie di alcolismo breve che godono ancora di buona salute. È una glicoproteina in grado di legare il ferro, con elevata eterogeneità sia per il numero di atomi di ferro legati sia per il legame con catene glicaniche. Tali catene, residui di acido sialico legati alle sue estremità in numero da uno a otto danno luogo a nove diverse isomorfie di cui la tetrasialo è quella predominante (80%). Un'assunzione pari a 50-80 gr di etanolo al giorno per un periodo di due o più settimane porta a un aumento delle quantità relative di disialo-transferrina. Non esiste correlazione tra CDT ed età, anche se nelle donne i valori di transferrina sono più alti. I metodi analitici utilizzati sono: immunoturbimetria che prevede una separazione delle frazioni delle varie transferrine mediante cromatografia su colonna, separazione legata alla temperatura e non selettiva; nefelometria in cui l'anticorpo monoclonale non è in grado di discriminare tra le glicofornie asialo, mono e disialo; elettroforesi capillare che utilizza una misura con assorbimento a 200 nm, lunghezza d'onda aspecifica poiché altre molecole con stesso punto isoelettrico possono interferire se presenti in alte concentrazioni; HPLC con rivelatore U.V. a lunghezza d'onda di 460 nm. I punti di forza di quest'ultimo metodo, riconosciuto dall'IFCC come metodo d'elezione, sono: a) lunghezza d'onda della misura d'assorbimento di 460 nm che rende la tecnica specifica e sensibile; b) adeguata separazione tra le isoforme; c) quantificazione della disialo-transferrina; d) facile comprensione dei cromatogrammi.

**FIBROSI CISTICA: DAI GENI MODULATORI NUOVE PROSPETTIVE TERAPEUTICHE**

G. Castaldo<sup>1</sup>, O. Scudiero<sup>1</sup>, A. Elce<sup>1</sup>, G. Cardillo<sup>1</sup>, F. Borgia<sup>1</sup>, C. Bellia<sup>2</sup>, R. Tomaiuolo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Univ. di Napoli "Federico II" e CEINGE Biotecnologie avanzate scarl, & SEMM, Napoli

<sup>2</sup>Cattedra di Biochimica Clinica, Università di Palermo

L'espressione clinica della Fibrosi Cistica (CF) è estremamente eterogenea, e finora sono state identificate oltre 1500 mutazioni diverse nel gene-malattia (CFTR). In qualche caso è possibile prevedere il fenotipo e la prognosi della malattia in base al genotipo CFTR, ma in linea di massima non sembra esistere uno stretto rapporto tra il tipo di mutazione e il fenotipo della CF. In particolare è stato osservato che: a) l'espressione clinica della CF in pazienti con lo stesso genotipo CFTR può essere molto diversa; b) il fenotipo CF può variare all'interno della stessa famiglia: sono state descritte coppie di fratelli affetti, clinicamente discordanti tra loro nell'espressione epatica e/o polmonare della malattia. Questi risultati hanno un importante impatto clinico: pazienti affetti nell'ambito della stessa famiglia, possono richiedere una terapia diversa; una coppia che già ha un figlio affetto dalla malattia ed è in attesa di un secondo figlio va adeguatamente istruita - in sede di consulenza genetica - sul fatto che l'espressione clinica della malattia, nel secondo figlio, potrebbe essere diversa rispetto al primo.

Numerosi studi recenti hanno concluso che l'espressione clinica della CF sarebbe modulata da fattori ambientali, o da geni "epistatici" ereditati indipendentemente da CFTR e presenti in forme alleliche multiple, in grado di aggravare o mitigare l'espressione clinica della CF anche a livello di singoli organi (Castaldo G., et al. Liver expression in Cystic Fibrosis could be modulated by genetic factors different from the Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator genotype. *J Med Genet.* 2001). Tra questi, il sistema delle beta-defensine (hBD), piccoli peptidi cationici ad attività antimicrobica potrebbe contribuire a modulare l'espressione respiratoria. Il nostro gruppo di ricerca ha studiato i geni delle 4 hBD descrivendo un gran numero di polimorfismi, alcuni dei quali potenzialmente correlati al fenotipo respiratorio della CF (Vankeerberghen A., et al. Distribution of human beta-defensin polymorphisms in different control and cystic fibrosis populations. *Genomics* 2005). Altri geni, tra cui l'alfa-1-antitripsina agirebbero da geni modulatori del fenotipo epatico.

Oltre alla forma classica, severa di malattia, sono state identificate forme cliniche di CF definite "atipiche" che si esprimono con fenotipo monosintomatico (pancreatiti ricorrenti, agenesia bilaterale congenita dei dotti deferenti, asma, bronchiectasie, etc.), e con prognosi benigna rispetto alla forma classica, severa di CF. In molti di questi pazienti è presente una mutazione "severa" del gene CFTR identica a quelle presenti nella forma classica della malattia, ed una mutazione lieve che produce un'attività residua del canale CFTR (in genere dominante rispetto a quella severa). E' quindi essenziale sottoporre i pazienti con forme atipiche di CF all'analisi molecolare, e una volta identificate mutazioni del gene estendere lo

studio all'eventuale partner e, in sequenza, ai membri sempre più lontani della famiglia. In questo programma di screening "a cascata" gioca un ruolo fondamentale la consulenza genetica multidisciplinare al paziente e alle famiglie.

Tra le forme atipiche di CF, è compresa l'agenesia bilaterale congenita dei deferenti (CBAVD), responsabile di sterilità maschile. Circa un terzo dei casi di sterilità sono legati a problemi maschili, di cui alcuni ben noti come alterazioni del numero, della motilità o della morfologia degli spermatozoi, ostruzioni o agenesia dei dotti deferenti; in altri casi la causa della sterilità non è nota. Tra le forme a patogenesi nota vi sono le due forme di azospermia ostruttiva: CBAVD o CUAVD (agenesia congenita bilaterale o monolaterale dei dotti deferenti) responsabili di circa il 6% dei casi di azospermia ostruttiva e dell'1-2% dei casi di infertilità maschile.

Negli ultimi due-tre anni, infine, gli studi sulla genetica della Fibrosi Cistica hanno seguito direzioni diverse: 1) si è osservato che varianti geniche nelle regioni non codificanti del gene CFTR potrebbero avere un ruolo come mutazioni causali di malattia, alterando i processi di splicing o di regolazione dell'espressione genica; 2) in alcuni casi, anche varianti geniche nelle regioni codificanti che non determinano cambi aminoacidici potrebbero influenzare il processo di splicing e quindi agire da mutazioni causali di malattia; 3) è stato osservato che esistono diverse proteine in grado di interagire con CFTR aumentandone fino a 6 volte l'attività, e tra queste la famiglia dei carrier SLC26 (Gray MA., Bicarbonate secretion: it takes two to tango. *Nature Cell Biology* 2004; Ko SBH., et al. Gating of CFTR by the STAS domain of SLC26 transporter. *Nature Cell Biol.* 2004) e quindi mutazioni in questi geni potrebbero tradursi in una difettosa attivazione di CFTR.

La Fibrosi Cistica quindi, sembra aver perso i suoi due aspetti più caratterizzanti: non è più una malattia di sola pertinenza pediatrica, e forse non è neanche più una malattia monogenica pura. La stretta interazione tra tutti gli ambienti specialistici clinici coinvolti (che dovranno segnalare al laboratorio il sospetto clinico di ciascun paziente) e l'ambiente di laboratorio (che, in base al sospetto clinico, adotterà tecnologie di indagine molecolare più o meno estese del gene CFTR) garantiranno la possibilità di utilizzare al meglio la diagnostica molecolare e informare correttamente il paziente e la sua famiglia mediante una consulenza genetica multidisciplinare sempre più mirata. Nello stesso tempo però, la conoscenza dei complessi meccanismi patogenetici della malattia e delle sue forme "atipiche" porterà ad approcci terapeutici innovativi.

**POLLUTION AND HEALTH: BIOMONITORING IN HUMAN**V. Sorrenti<sup>1</sup><sup>1</sup>*Department of Biochemistry, Medical Chemistry and Molecular Biology, Univ. Catania*

Introduction. Every year several chemicals as domestic, industrial wastes and pharmaceuticals are distributed in the environment causing potentially harmful effects. By now is particularly interest the attention toward word "status health".

Oxidative damage is due to imbalance between prooxidant and antioxidant species.

Evidence suggest the pathological role of free radicals in a variety of diseases, including atherosclerosis, chronic inflammation and cancer (1). Plasma and other biological fluids are rich in antioxidant molecules; since the antioxidant status of human plasma is dynamic and can be affected by many factors including diet, physical exercise, injury and disease, it is interesting to evaluate the relationship between plasmatic non-proteic antioxidant capacity and markers of oxidative stress in plasma of subject exposed to environmental pollution.

Materials and methods. The study was effected on 50 healthy subjects (40-55 years) of Priolo, Melilli, Augusta and of control area (Catania and hinterland).

Heparinized venous blood (15 cc) was collected after overnight fasting; plasma was separated by centrifugation at 800 g for 20 minutes. Plasma samples were immediately analyzed for marker of oxidative stress: non-proteic antioxidant capacity (NPAC); lipid hydroperoxide levels; total thiol groups concentration; nitrite and nitrate levels.

Results and discussion. Data obtained in this study demonstrated a significant decrease in NPAC and in total thiol groups in plasma of subjects living in Priolo, Melilli, and Augusta compared with subject of control area. According to decrease of antioxidant defences, lipid hydroperoxide levels, nitrite and nitrate levels and oxidized proteins levels were increased.

The changes in the plasma levels of antioxidant and prooxidant species better reflects the real oxidative stress and "health status" of a subject.

Results obtained in the present study allow us to affirm that subjects living in Priolo, Melilli and Augusta have decreased antioxidant defences and these data may be related to high incidence of neoplasia and neonatal malformations that may be found in this area.

The results of this study permit to confirm that oxidative stress is elevated in subjects exposed to environmental pollution and demonstrated that there is a relationship between "antioxidant status", healty of human and environmental pollution.

**References**

1. Di Giacomo C, Acquaviva R, Lanteri R, et al. Non proteic antioxidant status in plasma of subjects affected by colon cancer. *Exp Med Biol* 2003;228:525-8.

**LA DIAGNOSTICA MOLECOLARE NELLE SINDROMI MALFORMATIVE**T. Mattina<sup>1</sup><sup>1</sup>*Università di Catania*

Le sindromi malformative colpiscono spesso pesantemente i pazienti che ne sono affetti, la famiglia di cui fanno parte, la società che gravita attorno. È necessario affrontare in maniera decisa, costruttiva ed efficace il carico imposto da una sindrome malformativa: A questo scopo punto di partenza per un approccio corretto è la disponibilità di informazioni complete in merito alla patologia stessa. Il punto di partenza è, pertanto, la diagnosi.

Per alcune sindromi malformative il quadro clinico è molto ben definito e riconoscibile e la diagnosi clinica è facile e pronta. In una discreta frazione di questi casi la diagnosi clinica può essere sostenuta da una conferma con tecniche di diagnostica molecolare. Si potrebbe ritenere che nel caso di diagnosi clinica "facile" che offra pochi dubbi e non imponga ripensamenti diagnostici o difficoltà alla diagnosi differenziale, la conferma molecolare sia un orpello, un'esercitazione inutile, o quantomeno un passaggio non necessario, in definitiva, una spesa non necessaria. Viceversa anche in questi casi, la possibilità di disporre di tecniche per la diagnosi molecolare aggiunge informazioni che risultano di grande utilità per la gestione del problema nel suo complesso: implicazioni prognostiche, valutazione del rischio di ricorrenza, possibilità di diagnosi prenatale, ecc.

A maggior ragione, la disponibilità di tecniche diagnostiche molecolari è indispensabile a confermare diagnosi di sospetto, a dirimere diagnosi meno certe, o diagnosi riguardanti patologie che è noto essere eterogenee sul piano genetico. La diagnosi molecolare è pertanto necessaria per una conferma della diagnosi clinica. Il risultato del test può esitare nella conferma diagnostica, o, al contrario, nell'esclusione della diagnosi sospettata, o, infine risulta in una mancata diagnosi, in questo casi si apre la strada per la ricerca di tecniche diagnostiche alternative oppure quella di ipotesi diagnostiche alternative.

La diagnosi molecolare ha consentito spesso di chiarire le basi patogenetiche di alcuni aspetti del quadro clinico che emergono dalla osservazione del rapporto fra genotipo e fenotipo, dalla identificazione del gene mutato, dalla natura della mutazione. La diagnostica molecolare delle sindromi malformative ha consentito di identificare all'interno di fenotipi omogenei, una etiopatogenesi eterogenea sul piano genetico (splitting) o al contrario, di riunire sotto lo stesso ambito genetico-molecolare quadri clinici dissimili, (lumping). È stato possibile chiarire i rapporti patogenetici di sindromi clinicamente correlate ma geneticamente eterogenee e identificare le ragioni delle diversità nell'espressione fenotipica di patologie geneticamente omogenee. La diagnostica molecolare consente maggiore chiarezza sulle anomalie "metaboliche" risultanti dalla mutazione e consente di trarre conclusioni ipotetiche sull'evoluitività del quadro clinico, rischi connessi con la diagnosi, prognosi della patologia. Quest'ultima può variare anche in presenza di quadri clinici apparentemente indistinguibili sulla base della mutazione identificata.

La diagnostica molecolare apre ipotesi speculative di vario tipo: possibilità di nuovi approcci diagnostici, informazioni su processi metabolici, ereditabilità di specifici traits, influenza di fattori ambientali o di altri fattori genetici, ipotesi terapeutiche di supporto, ipotesi di terapia sostitutiva o terapia genica.

La diagnostica molecolare (FISH, CGH, ecc) affianca e completa anche le diagnosi di patologia cromosomica consentendo una precisa definizione dei riarrangiamenti già identificati con il cariotipo, con l'indicazione esatta dei punti di rottura. Con queste tecniche è possibile un confronto cariotipo fenotipo, la mappatura di geni malattia, l'identificazione delle diversità fenotipiche eventualmente legate all'origine parentale del cromosoma riarrangiato.

#### **CARATTERIZZAZIONE GENOTIPICA DI CEPPI DI BRUCELLA ISOLATI DA CASI DI BRUCELLOSI UMANA IN SICILIA**

C. Santangelo<sup>2</sup>, C. Marianelli<sup>1</sup>, Xibilia<sup>2</sup>, C. Graziani<sup>1</sup>, A. Imbriani<sup>2</sup>, R. Amato<sup>3</sup>, D. Neri<sup>3</sup>, Cuccia<sup>4</sup>, S. Rinnone<sup>4</sup>, V. Di Marco<sup>5</sup>, F. Ciuchini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ist. Superiore di Sanità, Dip. di Sanità Alimentare ed Animale, Roma

<sup>2</sup>A.O. Vittorio Emanuele, Dipartimento di Microbiologia, Catania

<sup>3</sup>A.O. Gravina, Dipartimento di Microbiologia, Caltagirone

<sup>4</sup>Azienda Unità Sanitaria Locale N. 3, Dipartimento di Prevenzione, Catania

<sup>5</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Barcellona Pozzo di Gotto

**Summary.** Brucellosis is a serious problem in Sicily. *Brucella melitensis* was identified as the species most frequently isolated in humans and animals in Italy. No epidemiological data from molecular typing of *Brucella* strains circulating in Italy, however, are available. We have conducted this study to characterize twenty clinical isolates of *B. melitensis* biovar 3 through the multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of 16 loci (MLVA-16). The MLVA-16 typing assay recognized 17 distinct genotypes.

**Introduzione.** La brucellosi è un importante problema di sanità pubblica in molti paesi del Mediterraneo. Si trasmette all'uomo attraverso il consumo di cibo contaminato o il contatto diretto/indiretto con animali infetti. Il principale agente zoonotico è rappresentato dalla *Brucella melitensis*, seguito dalla *B. abortus* e dalla *B. suis*.

In Italia, le misure di profilassi previste dalla normativa hanno portato all'eradicazione della malattia dalle regioni settentrionali e ad un sostanziale declino della brucellosi nelle regioni meridionali (da 923 casi notificati nel 2001 a 316 casi notificati nel 2005) (<http://www.ministerosalute.it/promozione/malattie/bollettino.jsp>). In Sicilia, con il 92.4% dei casi nazionali nel 2005, la brucellosi è endemica. In questa regione la persistenza della malattia è legata alla presenza di animali infetti, soprattutto piccoli ruminanti. L'allevamento ovi-caprino rappresenta la principale attività zootecnica ed è affidato a piccole aziende a conduzione familiare dove mancano procedure standard per la lavorazione del latte e dei suoi derivati e dove le condizioni igienico-sanitarie sono spesso carenti. Inoltre, comuni pratiche di allevamento come la transumanza, la promiscuità tra pecore, capre e bovini, lo scambio dei riproduttori fra gli allevatori, aumentano la possibilità di contaminazione, trasmissione e diffusione della malattia sul territorio. La *B. melitensis* è ritenuto l'agente eziologico principale della brucellosi in Italia, considerata una food-borne disease piuttosto che una malattia occupazionale (3, 4, 5). Lo scopo del nostro lavoro è quello di tipizzare gli isolati umani di *Brucella* poiché le strategie per il controllo e l'eradicazione della malattia derivano, prima di tutto, dalla caratterizzazione epidemiologica della malattia stessa.

**Materiali e metodi.** Venti ceppi di *Brucella* sono stati isolati da pazienti ricoverati con la diagnosi di brucellosi acuta a Catania, da Aprile 2005 a Maggio

2006. Nessuno dei pazienti apparteneva alla categoria a rischio professionale. Tutti gli isolati, ottenuti da colture di sangue dei pazienti con il sistema BACTEC 9120 (Becton Dickinson, Rutherford, NJ), sono stati sottoposti ad analisi microbiologica e molecolare. L'analisi microbiologica (richiesta di CO<sub>2</sub>, produzione di H<sub>2</sub>S, sensibilità alla tionina e fuxina basica, agglutinazione con sieri specifici (2)), ha permesso l'identificazione degli isolati come *B. melitensis* biotipo 3. L'analisi molecolare è stata eseguita mediante il saggio MLVA-16 (1, 6). Il ceppo di *B. melitensis* 16M, il cui profilo MLVA-16 è noto, è stato utilizzato come riferimento. Sono state utilizzate per ciascun isolato sedici coppie di oligonucleotidi corrispondenti ad otto minisatelliti (loci Bruce06, Bruce08, Bruce11, Bruce12, Bruce42, Bruce43, Bruce45 e Bruce55) ed otto microsattelliti (loci Bruce04, Bruce07, Bruce09, Bruce16, Bruce18, Bruce19, Bruce21 e Bruce30). Le amplificazioni sono state eseguite denaturando inizialmente a 94°C per 3 min seguite da 30 cicli a 94°C per 30 sec, 60°C per 30 sec e 72°C per 50 sec. Cinque microlitri di ciascun prodotto sono stati caricati su gel di agarosio al 2% per l'analisi dei minisatelliti, e al 3% per l'analisi dei microsattelliti. Per stimare l'esatta grandezza degli amplicati, i prodotti sono stati purificati e sequenziati direttamente tramite il sequenziatore a capillare ABI PRISM 310 ed usando il kit BigDye Terminator v1.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Gli elettroferogrammi sono stati assemblati mediante il software Navigator Sequenze (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Risultati e discussioni. In questo studio abbiamo caratterizzato venti ceppi umani di *Brucella* isolati a Catania nell'arco di un anno. Il consumo di ricotta è stato identificato come la via d'infezione più probabile. Lo studio delle caratteristiche fenotipiche ha permesso di identificare tutti gli isolati come *B. melitensis* biotipo 3. Allo scopo di comprendere meglio lo scenario epidemiologico, abbiamo utilizzato l'approccio molecolare del saggio MLVA-16, che consiste nell'amplificazione di 16 loci differenti per ciascun isolato e nel generare un profilo di bande multiple o fingerprint specifico. I 16 markers selezionati, sono una combinazione di 8 loci moderatamente variabili (minisatelliti) e 8 loci altamente variabili (microsatelliti). Il saggio MLVA-16 è stato recentemente utilizzato per analizzare ceppi di *Brucella* umani ed animali, provenienti da diversi Paesi, ed ha consentito l'individuazione di un numero elevato di differenti genotipi (1, 6). Non esistono, invece, dati circa la distribuzione dei genotipi di *Brucella* in aree endemiche ristrette. Tale informazione potrebbe aiutare a capire se esiste una correlazione tra genotipo e patogenicità della *Brucella*. Sebbene i nostri isolati umani abbiano una identica origine geografica, differenze sono state osservate in sette loci (Bruce08, Bruce12, Bruce04, Bruce07, Bruce09, Bruce16 e Bruce18), consentendo di raggruppare gli isolati in 17 distinti genotipi come mostrato in Tabella 1. I nostri risultati mostrano chiaramente che la *Brucella*, nonostante l'alto grado di omogeneità osservato tra le diverse specie, è altamente polimorfica a livello di minisatelliti e microsattelliti. Sono stati infatti identificati in un'area endemica ristretta 17 MLVA-fingerprint diversi appartenenti però alla stessa specie e stesso biotipo. Sebbene il saggio MLVA-16 non possa essere utilizzato

per l'identificazione del biotipo a causa dell'eterogeneità osservata nelle diverse specie di *Brucella* tale da impedire un raggruppamento omogeneo dei diversi biotipi, tale metodica si presta particolarmente allo studio delle epidemie. Il saggio MLVA-16 potrebbe essere usato per verificare la relazione genetica fra ceppi al fine di individuare la possibile sorgente di infezione. Ceppi, infatti, che presentano lo stesso MLVA-genotipo indicano una comune sorgente di infezione. I nostri risultati dimostrano l'alto potere discriminante della metodica MLVA-16 supportando il suo utilizzo a scopi epidemiologici.

#### Bibliografia

1. Al Dahouk S, Le Fleche P, Nockler K, et al. Evaluation of *Brucella* MLVA typing for human brucellosis. *J Microbiol Methods* 2007;69:137-145.
2. Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. *Techniques for the Brucellosis Laboratory*. Paris: Institut National de la Recherche Agronomique Publications, 1988.
3. Caporale V, Nannini D, Giovannini A, et al. Prophylaxis and control of brucellosis due to *Brucella melitensis* in Italy: acquired and expected results. Preventing of brucellosis in the Mediterranean Countries. Proceedings of the International Seminar C.I.H.E.A.M., C.E.C., MINAG (Malta), FIS (Malta) 1992;127-45.
4. De Massis F, Di Girolamo A, Petrini A, et al. Correlation between animal and human brucellosis in Italy during the period 1997-2002. *Clin Microbiol Infect* 2005;11:632-6.
5. Iaria C, Ricciardi F, Marano F, et al. Live nativity and brucellosis, Sicily. *Emerg Infect Dis* 2006;12:2001-2.
6. Le Fleche P, Jacques I, Grayon M, et al. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiol* 2006;6:9.

### MITOCHONDRIAL MARKERS IN MENTAL RETARDATION

C. Scuderi<sup>1</sup>, E. Borgione<sup>1</sup>, F. Castello<sup>1</sup>, C. Gagliano<sup>1</sup>, S. A. Musumeci<sup>1</sup>

<sup>1</sup>IRCCS Oasi Maria SS. Troina

**Introduction.** Mitochondrial encephalomyopathies are a heterogeneous group of diseases often associated with multisystemic presentations. Diseases due to mutations in mitochondrial DNA (mtDNA) are usually transmitted by maternal inheritance, but since most of the mitochondrial proteins are codified by nucleus, many mitochondrial disorders have mendelian inheritance.

Mitochondrial diseases may appear in infantile age, can be congenital and occur with defects in development, mental retardation (MR), and dysmorphism.

In an Italian study mitochondrial pathologies were the most frequent cause of metabolic disease in children and in adults; however, there are not epidemiological and clinical studies on people with MR.

Aim of this work is to identify clinical, biochemical and genetic mitochondrial markers in people with MR.

**Methods.** In our population with MR we selected 309 subjects, with muscular signs on clinical examination. Diagnostic item provides the identification of disease by clinical evaluation, brain NMR, laboratory exams, electromyography, genetic tests and, in 152 cases, muscular biopsy for histological, and histoenzymatic investigations, and dosage of respiratory chain complexes, Coenzyme Q10 (CoQ10), and Pyruvate Dehydrogenase (PDH).

Genetic tests included Southern Blot for the research of mtDNA large-scale rearrangements, RFLP analysis for the screening of known point mutations.

Besides mtDNA was amplified by polymerase chain reaction and was subjected to direct sequencing. Mutations in the POLG gene were identified using direct DNA sequencing.

**Results.** A total of 120 subjects had anomalies on morphological investigations, 26 showed a decreased activity of one or more complexes of respiratory chain, 2 had CoQ10 deficiency and 2 had PDH deficiency.

We found 4 patients with mitochondrial tRNA genes mutations and 1 patient compound heterozygous for POLG mutations. Besides 7 patients had mtDNA deletions.

In our cases the more frequent clinical signs of mitochondrial disease were changes in muscle tone, microcephaly, short stature, dysmorphism, epilepsy, ocular signs, EEG anomalies, cerebral and cerebellar atrophy, white matter or basal ganglia abnormal signals.

**Discussion.** Our study suggests that mitochondrial dysfunctions are among the most frequent metabolic causes of MR. In fact, a total of 40 patients presented evidence of mitochondrial disease on biochemical and/or genetic investigations, while in our population with MR we identified a total of 35 patients with other metabolic diseases prevalently amino acids metabolism disorders, organic acidurias and lysosomal diseases.

The identification of these patients is extremely important in order to prevent complications and to provide a fairer prognosis and a more appropriate genetic counselling.

### LA DIAGNOSI DELLE INFEZIONI VIRALI NELLE PATOLOGIE CARDIACHE

C. I. Palermo<sup>1</sup>, R. Russo<sup>1</sup>, D. Zappalà<sup>1</sup>, C. M. Costanzo<sup>1</sup>, G. Scalia<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Scienze Microbiologiche e Scienze Ginecologiche, Università degli Studi di Catania e U.O. Virologia Clinica Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico "Gaspere Rodolico" di Catania

Le cardiopatie non ischemiche costituiscono un ampio capitolo nell'ambito delle patologie cardio-vascolari. Di recente si è potuto stabilire che il 78% delle pericarditi ed il 71% delle miocarditi sono causate da virus. Le cardiopatie non ischemiche possono essere genericamente suddivise in: a) congenite manifeste o tardive, b) dell'infanzia e c) dell'adulto. In tale ambito appare essenziale rilevare che le congenite tardive sono più difficili da associare ad un virus a causa della manifestazione sintomatologica cronologicamente distante dalla gravidanza e dal parto.

In tali patologie nel neonato o nell'infanzia, quindi, si dovrebbe tenere in considerazione il ruolo di tutti quei virus che possono indurre infezione congenita specie in infezione materna acquisita nelle ultime settimane di gestazione. Nei casi di SIDS (sudden infant death syndrome), infatti, i virus possono essere responsabili di infezione asintomatica e fulminante acquisita dopo la nascita, ma potrebbero essere responsabili dei casi di SIDS perinatale.

Tra i virus più frequentemente coinvolti nelle patologie cardiache congenite sono considerati il cytomegalovirus, il virus della rosolia, i virus Coxsackie, gli adenovirus. Anche patogeni "marginali" come parvovirus B19 (PVB19) ed herpes 6 umano (HHV6) sono responsabili di una grande parte delle patologie cardiache. Ad essi si è aggiunto il virus chikungunya che pare causi miocardite neonatale successiva ad infezione primaria materna.

Come detto, nei casi di manifestazione tardiva o nei casi di patologia cardiaca dell'infanzia la determinazione dell'agente etiologico può essere ardua.

Un adeguato controllo ed eventuale monitoraggio della gravida potrebbe prevenire il rischio di patologie cardiache congenite cui, a nostro parere, appartengono parte di quelle dell'infanzia. La paziente non immune per HHV6 o per PVB19 dovrebbe essere istruita in modo da evitare il rischio di infezione primaria, di norma la più grave.

Per ciò che attiene alle cardiopatie dell'adulto, dal punto di vista etiopatogenetico, vi è una rilevante differenza tra le miocarditi e le pericarditi. Le prime che si consideravano dovute ad infezione da Enterovirus, sono attribuite a parvovirus B19 in oltre il 50% dei casi ed a HHV6 in più del 20%. Inoltre, circa il 15% dei soggetti affetti da miocardite presentano una infezione "multipla" in cui, però, uno dei virus coinvolti risulta essere sempre o PVB19 o HHV6. Il ruolo retto da Enterovirus è ridimensionato a meno del 10%.

Per ciò che attiene alle pericarditi, è decisamente più frequente il reperimento di RNA di enterovirus mentre gli altri due agenti virali citati sono rilevabili solo nei casi di pericardite consensuale a miocardite.

Da quanto detto si evince come l'uso della biologia molecolare nella diagnostica virologica abbia consentito

l'identificazione della etiologia di numerose patologie tra cui quelle cardiache.

La sensibilità e la specificità di queste metodiche sono un importante ausilio nello studio dei virus in patologia umana e nella diagnostica virologica avanzata.

Quindi il ruolo della virologia clinica anche in questo settore sembra essere di grande rilievo sia in fase diagnostica sia nell'affiancare il clinico nel management del paziente.

Come si è evidenziato finora, la diagnosi più attendibile è quella eseguibile in campioni patologici provenienti dal sito di probabile infezione ma sovente si tratta di prelievi invasivi e cruenti. A tale proposito la ricerca di virologia clinica dovrebbe tendere ad ottenere sistemi diagnostici poco invasivi che consentano di porre diagnosi in tempi brevi e con l'impiego di campioni patologici facilmente ottenibili.

L'impiego solo di tecniche molecolari, però, non può essere sufficiente per ottenere un miglioramento in termini di salute dell'uomo, c'è bisogno anche e soprattutto "dell'uomo": proprio la vastità e la complessità delle metodiche diagnostiche ha posto in risalto la figura del Virologo Clinico che, non sostituendosi, ma affiancando il clinico, offre un significativo miglioramento della diagnostica in termini di tempi, spesa e conoscenza. Ciò potrà condurci, nel caso in cui si riesca a saper gestire i dati epidemiologici e clinici, ad agire correttamente, in primo luogo attuando una corretta prevenzione e poi, ove possibile, un adeguato trattamento.

## MULTI-GENE POLYMORPHISM PROFILE TO PREDICT THE RISK OF ALZHEIMER'S DISEASE OR ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION IN HEALTHY SUBJECTS

F. Licastro<sup>1</sup>, M. Chiappelli<sup>1</sup>, C. M. Caldarera<sup>2</sup>, E. Porcellini<sup>1</sup>, C. Caruso<sup>3</sup>, D. Lio<sup>3</sup>, E. H. Corder<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Dept of Experimental Pathology, School of Medicine, University of Bologna, Italy

<sup>2</sup>Istituto Nazionale Ricerche Cardiovascolari, Imola, Italy

<sup>3</sup>Dept of Biopathology and Biomedical Methodology, University of Palermo, Italy

<sup>4</sup>Center for Demographic Studies, Duke University, Durham, USA

**Introduction.** Gene variants that modulate inflammation and cholesterol metabolism have been associated with acute myocardial infarction (AMI) and Alzheimer's disease (AD). To better distinguish genetic backgrounds, we investigated a panel of relevant polymorphisms (IL10 -1082G/A, IL6 -174G/C, TNF -308G/A, IFNG +874T/A, SERPINA3 -51G/T, HMGCR -911C/A, APOE e2/3/4).

**Method:** Study subjects: The sample consisted of 280 patients with AMI, 257 patients with clinical diagnosis of probable AD and 1307 presently unaffected persons, i.e. 'controls'. Genetic determinations: RT-PCR methodology was used to investigate the genetic polymorphisms. The data analytic approach: The goal was to identify extreme pure type risk sets representing high intrinsic risk for AMI and AD and others representing low intrinsic risk for these disorders employing grade-of-membership analysis (GoM). Membership scores are automatically generated for each subject denoting degree of resemblance in each model-based group.

**Results.** A grade-of-membership statistical analysis identified six extreme pure type risk sets I to VI. Each individual was included in one or several sets by membership scores. Sets I to III represented low risk (I) or low risk < age 65 (II, III): subjects like these categories lacked pro-inflammatory alleles for HMGCR + TNF + APOE. Sets IV to VI represented elevated risk: individuals like these groups carried pro-inflammatory alleles for IL10 + IFNG + SERPINA3. Outcome was influenced by the co-inheritance of additional pro-inflammatory alleles: patients with AMI < age 40, or AD < age 65, often resembled IV (HMGCR); set V was typical for AMI ages 55+ (TNF + IL6). The last risk set (VI, APOE e4) represented AMI at intermediate ages (40 to 55 years) and late onset AD (> 65 years). The membership of individuals in the sets varied widely defining a >200-fold range in risk.

**Conclusion.** We conclude that AMI and AD share determinants involving cholesterol metabolism and the up-regulation of inflammation. Pro-inflammatory alleles for TNF + IL6 are central to AMI from age 55 onward, as opposed to AD. These findings demonstrate the utility of considering multiple candidate polymorphisms together.

### COCAINE: HABITS OF USE AND WARNINGS FOR THE LABORATORY

T. Macchia<sup>1</sup>, S. Gentili<sup>1</sup>, G. Merola<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento del Farmaco, Reparto Tossicodipendenza Farmacodipendenza e Doping, Istituto Superiore di Sanità Roma

**Purpose.** To consider the relation between habits of drug use and suitability of different analytical choices aiming to toxicological control.

**Method:** analysis of epidemiological indicators to point out patterns and habits of cocaine use. Cocaine represents, also in Italy, a growing problem of public health: 4 users out of 10 in public services have significant problems related to cocaine; proportion of young people no longer experimenters, but users, is growing; in the period 2001-2006, the number of cocaine-related deaths has increase of 3 times.

**Results.** A more careful reading of some indicators and users' drug testing in various biological matrices suggested a broader dimension of cocaine use. Analytical approach is made worst by the mix of old-new substances, the young age of most of users, health repercussion, social consequences, safety implication, the increasing complexity of problems involving analytical investigations. Regards on this last, some issues need to be underlined: -variety of new psychoactive substances which are used could make unsuitable a testing with usual screening methods by which traditional classes are pointed out; -furthermore, polydrug use entails the presence at the same time of several substances, each of them with a good chance of being below the cutoff routinely used. Through this reason several samples could be lost as negative and so they are not submitted to confirmation.

**Conclusive considerations.** Attention must be paid on some technical aspects affecting procedural and instrumental laboratory choices. In particular, choice of the biological matrix, suitability of the cut-off, characteristics of analytical samples, qualitative and quantitative meaning of detection, stability of analytes in different matrices, windows of analytical detection, use and eligibility of on-site devices. Besides urine, alternative matrices as oral fluid and sweat, are used by an increasing number of laboratories in the world as a result of their suitability "regulated" in the proposals of SAMHSA-HHS and evaluated in a number of scientific papers. Lastly laboratories have to be properly acquainted with substances used in its territory, taking in mind that analytical performance is affected by the prevalence of factors to be detected.

### APPLICAZIONI DELLA PROTEOMICA NELLA DIAGNOSTICA ALLERGOLOGICA

G. Tringali<sup>1</sup>, A. M. Roccazzello<sup>1</sup>, R. Veca<sup>1</sup>, V. Torrisi<sup>1</sup>, D. Roccaro<sup>1</sup>, R. Attaguile<sup>1</sup>, G. Belluomo<sup>1</sup>, L. Scierri<sup>1</sup>

<sup>1</sup>I.R.M.A. -s.r.l. - Istituto Ricerca Medica e Ambientale di Acireale

Le allergie IgE-mediate rappresentano un problema ad elevato impatto socio economico crescente per le nazioni industrializzate: oggi i disturbi allergici influiscono infatti sul 25% della popolazione mondiale. Il riconoscimento degli allergeni da parte delle IgE costituisce l'evento centrale nella patogenesi dell'allergia di tipo I ed in particolare dall'affinità di legame delle regioni Fab con l'antigene. I ripiegamenti strutturali dell'antigene (allergene) sono di primaria importanza nel meccanismo di sensibilizzazione e nella risposta anticorpale: se l'antigene è conformazionale (denaturandosi al calore più facilmente di quello lineare) induce generalmente allergie meno gravi, ed è inoltre necessaria una maggiore quantità di allergene per scatenare una reazione allergica; se l'antigene è sequenziale (termostabile) induce di norma reazioni più gravi, con minime concentrazioni. Es. è la struttura molecolare della caseina in cui la conformazione  $\alpha$ -è associata alla forma termostabile, mentre la  $\kappa$  a quella termolabile.

Le proteine ricombinanti rappresentano un importante traguardo nei dosaggi immunometrici: si tratta di proteine perfettamente corrispondenti alle molecole naturali che permettono l'esecuzione di analisi più specifiche e sensibili di quelle tradizionali, come la valutazione dell'ipersensibilità all'Anisakis simplex che compare talvolta dopo molte ore dall'assunzione di pesce infestato. Infatti nel microarray allergy, saggio immunologico che consente la precisa identificazione della specifica molecola che causa la sintomatologia allergica, grazie all'utilizzo di un supporto solido (biochip) su cui sono immobilizzati gli allergeni ricombinanti, si è reso possibile un sensibile miglioramento della standardizzazione e sensibilità della diagnosi in vitro. Se nel siero si trovano anticorpi IgE specifici (sIgE) contro uno o più antigeni, questi si legano solo al sito (spot) dove si trovano i suddetti allergeni; il legame sIgE-allergene viene rilevato attraverso l'utilizzo di anticorpi fluoresceinati anti-IgE umane. Per la rilevazione si effettua una scansione con laser confocale, e con l'ausilio di un software vengono estrapolati i risultati.

Recenti studi, dal confronto dell'allergogramma proteomico (APM) mediante la tecnologia dei microarray con la classica ricerca delle sIgE effettuata con chemiluminescenza potenziata (definito impropriamente RAST), hanno evidenziato su una casistica di 250 soggetti con il 48 % di campioni positivi all'APM, i seguenti risultati: per 14 fonti allergeniche (parietaria, codolina, lattice, grano, ape, aspergillo, ecc) si è ottenuta una perfetta coincidenza dei due metodi; 17 allergeni proteici relativi a 13 fonti allergizzanti (tra cui betulla, lattice, carota, grano, ananas, mela, ecc) sono risultati negativi in entrambi i metodi deducendo che le sensibilizzazioni ai predetti allergeni si possono considerare rare in Sicilia; infine 4 fonti allergeniche (Nocciolo, Orzo, Anisakis ed epitelio di cane) sono stati rilevati solo dall'APM. I dati permettono quindi di definire che il microarray è più efficace dal punto

di vista diagnostico, in particolar modo per l'Anisakis e l'epitelio di cane e in riferimento agli alimenti per le proteine del latte. Inoltre dalla correlazione dell'APM, ECP ed IgE totali si è ottenuta la più alta correlazione (24%) con valori di sIgE, ECP e IgE totali positivi. Risultati che hanno confermato la validità di impiegare tali parametri come screening allergologico, nella sindrome da Iper-IgE (sindrome di Giobbe) e nella valutazione preventiva delle allergopatie nei soggetti pediatrici. Le conclusioni sono che il RAST possiede un'ampia scelta di allergeni testabili ma è il microarray che si distingue: sia per la sua sensibilità, sia per la specificità delle singole proteine allergizzanti non evidenziate sugli estratti; prevede eventuali reazioni crociate, le modalità di consumo degli alimenti, riducendo i disagi delle diete di esclusione; saggia allergeni rari quali anisakis, blatte; valuta anche allergeni occulti (contaminazione di acari in epitelio di cane). Per quanto detto, l'attuale orientamento è quello di considerare il microarray test di 2° livello, da effettuarsi per approfondire la diagnosi di particolari sottogruppi di pazienti già sottoposti al prick o ai test immunoenzimatici classici.

#### **POSSIBLE INTERACTIONS BETWEEN SINGLE NUCLEOTIDE GENETIC POLIMORPHISMS (SNPs) IN SOME NEURODEGENERATIVE DISEASES**

M. Currò<sup>1</sup>, N. Ferlazzo<sup>1</sup>, G. Gorgone<sup>1</sup>, G. Loccisano<sup>1</sup>, D. Caccamo<sup>1</sup>, R. Ientile<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Department of Biochemical, Physiological and Nutritional Sciences, University of Messina*

Several studies have shown a relationship between vascular damage and neurodegenerative diseases, such as, in particular, Alzheimer's disease and senile dementia (Altamura et al., 2007). However, a possible correlation between laboratory parameters and neurodegeneration onset has not been clearly demonstrated. Moreover, the role played by different risk factors is still not well documented. Hypertension, diabetes mellitus, hypercholesterolemia, and heart failures, like atrial fibrillation, are associated with a higher probability to develop dementia by a likely dual mechanism, which involve alterations of blood circulation in the brain and increases of neuronal cell degeneration, such as that observed in Alzheimer's disease. The management of vascular risk factors by either pharmacological tools or a suitable life style may provide an effective prevention of cognitive decline. Some gene polymorphisms are known as risk factors for the development of neurodegeneration. Among these, a major role is played by genetic variants of apolipoprotein E, since the ApoE2 variant reduces the risk for dementia while the ApoE4 increase it. In this context, alterations in homocysteine (Hcy) plasma levels, that is mild or severe hyperhomocysteinemia more frequently occurring in elderly people, have recently been related to cognitive decline and neurodegenerative diseases. Increases in Hcy plasma levels are often observed in the presence of vitamin deficiency associated with some genetic variants of enzymes related to homocysteine metabolism, such as the thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) due to the well known mutation C677T. However, other polymorphisms have been recently indicated as possibly involved in hyperhomocysteinemia development. In particular, some polymorphisms of nitric oxide synthase 3 gene (eNOS) are very interesting, given the role that endothelial NO plays in vascular contraction, platelet aggregation and cell adhesion. It has recently been demonstrated that the G894T polymorphism of eNOS produces a reduction in endothelial NO production. Further, the occurrence of this polymorphism has been associated with high Hcy plasma levels in non-smokers, suggesting that NO is able to modulate Hcy concentration by interference with folate metabolism. In this study, the distribution of the G894T polymorphism in a population of patients affected by dementia was not significantly different from that observed in matched healthy subjects. However, co-variance analysis showed an effect on Hcy levels in homozygous individuals, suggesting a possible synergism between the G894T eNOS mutation and the C677T MTHFR one. These results suggest that the G894T polymorphism of eNOS gene may affect Hcy plasma

levels, even though less significantly than the mutation C677T of MTHFR. Therefore, the characterization of G894T eNOS polymorphism could be useful for the evaluation of atherosclerotic risk associated with some neurodegenerative diseases.

#### **VALENZA DEI DATI DI LABORATORIO ED OPERATIVI NELLA PERIZIA TOSSICOLOGICA GIUDIZIARIA**

D. Geraci<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Ricercatore confermato Medicina legale, Università di Catania*

Parole chiave: prova giuridica, margine d'errore, valenza clinica e giuridica del risultato tossicologico, perizia o consulenza giudiziaria in ambito tossicologico, modalità operativa campionatura, estrazione ed analisi, rilievi circostanziali e biologici.

La prova giuridica è l'insieme dei rilievi motivati che formano il libero convincimento del Giudicante nella ricostruzione dei fatti illeciti. In ambito clinico un margine d'errore del risultato è comprensibile e tollerabile ciò non si può dire in ambito della costituzione della prova dove una piccola variazione quantitativa può modificare la configurazione del reato. Il rigore scientifico del metodo di campionatura, estrazione ed analisi riveste grande importanza nella valenza giuridica del risultato qualitativo e quantitativo. La certezza scientifica, quale esclusione o riduzione del margine dell'errore, è il risultato di una metodica applicativa trasparente, rigorosa, scientificamente valida (protocolli applicativi) riportata in maniera dettagliata nella relazione di perizia o di consulenza giudiziaria al vaglio dei consulenti tecnici delle parti. La relazione giudiziaria scritta (perizia o consulenza giudiziaria), è l'elemento fondante la prova; pertanto è necessario che questa sia chiara, completa e veritiera nell'applicazione delle metodologie specifiche condivise. (Protocolli) La campionatura del reperto in esame, deve essere omogenea per caratteri morfologici. Il dato tossicologico deve essere rapportato all'individuo (rilievo biologico). Infine si riporta un caso giudiziario dove il risultato tossicologico è corretto e contestualmente è forviante come prova giuridica in quanto poco attento al dato circostanziale; la presenza di bromazepam nel contenuto gastrico di un soggetto morto per ferite d'arma bianca permetteva di stabilire, senza tener conto dei dati circostanziali (rilevi autoptici) che il farmaco era in fase di assorbimento e l'ora della morte era individuata tra 1-2 ore dall'ingestione del farmaco. Le ferite da taglio al collo avevano provocato una sommersione interna e la contaminazione del contenuto gastrico con sangue proveniente dai grossi vasi del collo vanificava la valenza del risultato tossicologico.

Il risultato tossicologico, deve essere sempre correlato con i rilievi circostanziali e biologici, per essere elemento fondante della prova giuridica.

### GAP JUNCTION PROTEINS AND EPILEPSY: GENE EXPRESSION ANALYSIS IN HUMAN DISEASES AND EXPERIMENTAL MODELS

A. Trovato Salinaro<sup>1</sup>, A. Andrioli<sup>2</sup>, R. Garbelli<sup>4</sup>, N. Musso<sup>1</sup>, L. Tassi<sup>5</sup>, G. Mudò<sup>3</sup>, V. Barresi<sup>1</sup>, N. Belluardo<sup>3</sup>, R. Spreafico<sup>4</sup>, M. Bentivoglio<sup>2</sup>, D. F. Condorelli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Chemical Sciences, Section of Biochemistry and Molecular Biology, University of Catania

<sup>2</sup>Dept. Morphol. Biomed. Sci., University of Verona

<sup>3</sup>Dept. of Experimental Medicine, Section of Human Physiology, University of Palermo

<sup>4</sup>Dept. of Experimental Neurophysiology, National Neurological Institute "C. Besta", Milano

<sup>5</sup>Epilepsy Surgery Centre "C. Munari" Niguarda Hospital, Milano

**Introduction.** The gap junction proteins are encoded by a large multigene family, whose members, the connexins (Cx), are also expressed in the CNS. While Cx36 is expressed in GABAergic interneurons and some specific neuronal subpopulations, Cx43 and Cx30 are mainly expressed in astrocytes. Recent anatomical and electrophysiological data support the hypothesis of a correlation between gap junctions levels and the abnormal neuronal discharge observed in epilepsy. Aim of the research project was to investigate the expression and possible role of different Cxs in the pilocarpine animal model of epilepsy and in human cerebral biopsies from patients affected by drug-resistant-epilepsy.

**Materials and methods.** mRNA levels were measured by quantitative real-time RT-PCR using ABI Prism 7700 (Applied Biosystems). In situ hybridization was performed as described in Condorelli et al 2003.

**Results.** In the pilocarpine model we analysed changes in the expression of Cxs at 3, 6 and 24 hours after the onset of protracted seizures elicited by administration of the muscarinic cholinergic agent pilocarpine. Expression of Cx43 and Cx30 mRNAs exhibited a marked downregulation at 24h in neocortical and limbic cortical areas, including the hippocampal formation, and in the thalamus. Regional evaluation of the expression of Cxs under the same experimental paradigm with quantitative RT-PCR confirmed a 75% decrease of Cx43 and Cx30 mRNA levels 24 hours after pilocarpine injection. The data strongly implicate glial Cxs in the brain response to seizures, suggesting a possible involvement in post-ictal depression.

The expression of Cx32, 36, 43 and 45 was studied in samples of temporal cerebral cortex obtained from patients affected by architectural cortical dysplasia, Taylor-type cortical dysplasia and cryptogenetic epilepsy. In patients affected by cryptogenetic epilepsy the Cx36 mRNA levels were two times higher than in matching controls. A significant decrease of Cx45 was detected in epileptic patients affected by Taylor-type cortical dysplasia, while no significant changes of examined connexins was detected in architectural cortical dysplasia.

#### References

Condorelli et al. European Journal of Neuroscience 2003;18:1807-1827

Research funded by Fondazione Mariani

### ANTIPROLIFERATIVE EFFECTS OF GUANINE-BASED PURINES AND EXPRESSION OF A CANDIDATE RECEPTOR

R. Garozzo<sup>1</sup>, V. Barresi<sup>1</sup>, V. Di Liberto<sup>2</sup>, G. Mudò<sup>2</sup>, N. Belluardo<sup>2</sup>, D. Condorelli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Chemical Sciences, Sect. of Biochemistry, University of Catania, v.le A. Doria N. 6, Catania, Italy,

<sup>2</sup>Dept of Experimental Medicine, sect. of Human Physiology, University of Palermo, corso Tukory 129, Palermo, Italy

**Introduction.** Several studies have shown that guanosine exerts several biological effects in primary astroglial cultures, possibly through membrane receptors (1). Recently we analyzed the effects of several nucleotides, nucleosides and nucleobases on the cell growth of two different human glioma cell lines (U87MG, U373MG) and significant inhibitory effects were obtained with GMP, guanosine (GI50 = 100  $\mu$ M) and guanine (GI50 = 50  $\mu$ M). In the present work we report an attempt to identify the receptor involved and we analyzed the expression of the identified GPCR in the rat and human tissues.

**Material and Methods.** Adult Sprague Dawley rats and ten different human cell lines were used. Total RNA from human tissues was commercially obtained from Ambion, INC (Austin, TX). mRNA levels were measured using ABI PRISM 7700 Sequence Detection System with ABI PRISM Taq Man Probe from Applied Biosystems. A 378-bp rat identified receptor sequence subcloned in plasmid vector pCRII-TOPO (Invitrogen) was used as template for riboprobe and in situ hybridization was performed as previously described by Belluardo et al. (2)

**Results.** In this study we identified one orphan GPCR involved in the antiproliferative effects of guanosine and guanine by studying the expression of putative GPCRs with homology to adenosine and ATP receptors and by blocking their expression by siRNAs. We have shown that its basal expression is able to modulate the biological effects of the guanine-based purines. Analysis of mRNA levels by quantitative real time PCR revealed the expression of this GPCR in several rat and human tissues with different embryological origin. In situ hybridization studies confirmed the expression of this GPCR in many rat tissues including different cerebral areas and intestine.

- #### References
1. Ciccarelli R et al. Int J Dev Neurosci 2001;19:395-414
  2. Belluardo et al. Brain Research 2000;865:121-38

### ASSOCIATION OF GENE POLYMORPHISMS OF STEROID 5-ALPHA-REDUCTASE TYPE I (SRD5A1) IN PERIPHERAL ARTERIAL DISEASES (PAD)

N. Musso<sup>1</sup>, V. Barresi<sup>1</sup>, S. S. Signorelli<sup>2</sup>, M. Anzaldi<sup>2</sup>, E. Croce<sup>3</sup>, V. Fiore<sup>2</sup>, D. F. Condorelli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dep. of Chem. Sciences, Section of Biochemistry and Molecular Biology Faculty of Medicine, University of Catania (Italy)

<sup>2</sup>Dep. of Internal Medicine and Systemic Disease – Medical Angiology Section - University of Catania (Italy)

<sup>3</sup>“R. Guzzardi” Hospital - Vascular Surgery Unit - Vittoria (Italy)

Testosterone (T) plays a positive role against atherosclerosis antagonizing pro-inflammatory cytokines, improving vascular reactivity and acting on some metabolic patterns such as glycaemia and cholesterol. We analysed the genotypes of the steroid 5-alpha reductase isoenzymes (SRD5A1 and 2), whose activities are responsible for the intracellular conversion of T in dihydrotestosterone (DHT), in 145 patients with peripheral arterial disease (PAD). A significant decrease of the Hinfl RFLP “A” allele of SRD5A1 ( $p < 0.001$  by chi-square test) was observed in the PAD group; the frequency of homozygous individuals for the SRD5A1 “A” allele was reduced in PAD compared to controls ( $p < 0.01$ ; odds ratio 0.56). No differences were detected for the distribution of SRD5A2 genotypes.

The selected SRD5A1 gene variant is a single nucleotide polymorphism that has been significantly associated with an increased conversion of T in DHT. The hypothesis of a protective role of the increased intracellular activation of T against endothelial damage in lower limb arteries provides a rational basis for the association of SRD5A1 polymorphisms with PAD.

### EFFECT OF ROTENONE ON THE MITOCHONDRIAL TMRM SIGNAL

E. R. Testa<sup>1</sup>, H. J. Visch<sup>2</sup>, R. Testa<sup>3</sup>, P. H. Willems<sup>2</sup>, G. Parlato<sup>1</sup>

<sup>1</sup>U.O. di Chimica Clinica e Sperimentale, Policlinico Germaneto, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università “Magna Græcia”, Catanzaro

<sup>2</sup>Department of Membrane biochemistry and Microscopical Imaging Centre of the Nijmegen Centre for Molecular Life Sciences, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen, The Netherlands

<sup>3</sup>Dip. di Clinica Medica, Osp. Vittorio Emanuele, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Catania

Aim of this study. A model system of CI deficiency, treatment of control cells with rotenone for to analyse  $\Delta\Psi M$  of cancer cells.

Materials and methods. We studied the  $\Delta\Psi M$  of six different pathological fibroblasts lines: S2-7277, S4-4608, S4-5260, disease-causing mutations in the NDUF5-V genes of complex I. Fibroblasts were cultured in M199 medium, seeded on a glass coverslip, were loaded with either 20 nM or 100nM TMRM (tetramethyl rhodamine methyl ester). An inverted microscope, TMRM was excited at 540 nm. The camera exposure time was set at either 100 ms or 300 ms. All hardware was controlled with Metafluor 6.0 software. Image processing and analysis using Image Pro Plus 5.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Numerical results using Origin Pro 7.5.

Results. With the final aim to investigate whether  $\Delta\Psi M$  is reduced in patient-derived CI deficient fibroblasts, we first investigated whether changes in  $\Delta\Psi M$  occur in a model system of CI deficiency, namely treatment of control cells with 100 nM rotenone for three days. In the grey level distribution of TMRM in control cells treated with rotenone during 72 h is compared to untreated cells showed a reduction in CI activity to 20% (Koopman et al., 2005a). Similar to a 5 min treatment with 0.3  $\mu M$  antimycin A, this rotenone treatment simulated specifically the effects in patient cell lines with isolated CI deficiency, presenting a peak of 30% mitochondrial TMRM pixels in treated cells more than untreated-cells for the first interval of gray values (1-50). Whereas for the last interval of 201-254 gray value of mitochondrial activity it showed a peak of 20% mitochondrial TMRM pixels in treated-cells less than untreated-cells, for low intensity in mitochondrial reduction activity.

Conclusions. The treatment of control cells with rotenone for to analyse  $\Delta\Psi M$  of cancer cells concludes that TMRM-based method is valuable in CI deficiency.

**EFFECT OF CIII AND CI INHIBITION ON  $\Delta\psi$ M IN LEIGH SYNDROME**E. R. Testa<sup>1</sup><sup>1</sup>*U.O. di Chimica Clinica e Sperimentale, Policlinico Germaneto, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università "Magna Græcia", Catanzaro*<sup>2</sup>*Department of Membrane biochemistry and Microscopical Imaging Centre of the Nijmegen Centre for Molecular Life Sciences, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen, The Netherlands*<sup>3</sup>*Dip. di Clinica Medica, Osp. Vittorio Emanuele, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Catania*

Aim of this study. To see whether inhibition of the proton-pumping CIII of the OXPHOS system affected  $\Delta\psi$ M, control cells were treated with antimycin A, a specific CIII inhibitor

Materials and methods. We studied the  $\Delta\psi$ M of six different pathological Leigh S. fibroblasts lines: S4-5260 and S7-5175, disease-causing mutations in the NDUF5 genes of complex I. Fibroblasts loaded with either 20 nM or 100nM TMRM (tetramethyl rhodamine methyl ester). An inverted microscope, TMRM was excited at 540 nm. The camera exposure time was set at either 100 ms or 300 ms. All hardware was controlled with Metafluor 6.0 (Universal Imaging Corporation, Downingtown, PA). Image processing and analysis using Image Pro Plus 5.1. Numerical results using Origin Pro 7.5 (Originlabs, Northampton, MA).

Results. To investigate whether this method is able to report a reduction in  $\Delta\psi$ M, TMRM-loaded control (C1) cells were treated with antimycin A, which is an inhibitor of Complex III (cytochrome c reductase) of the oxidation phosphorylation system. Treatment with 0.3  $\mu$ M antimycin A did not nor result in a loss of TMRM pixels from the mitochondria. We found that increasing the drug concentration decreased the TMRM intensity after 5 minutes, indicative of a less negative  $\Delta\psi$ M. Inspection of the grey level histogram revealed that this was caused by an increase in the number of mitochondria with a low TMRM fluorescence at the cost of the number of mitochondria with a high TMRM signal (Vish et al., 2005). Here we observed that rotenone treatment (100 nM, 72 h) significantly reduced TMRM fluorescence. This demonstrates that the TMRM method is considerably more sensitive than R123 staining for detecting changes in  $\Delta\psi$ M.

Conclusions. This demonstrates that the TMRM method is considerably more sensitive than R123 staining for detecting changes in  $\Delta\psi$ M.

**PHOTOSENSITIZATION INDUCED BY RUFLOXACIN LEADS TO MUTAGENESIS IN YEAST**M. E. Serrentino<sup>1</sup>, L. Americo<sup>1</sup>, A. Catalfo<sup>1</sup>, E. Sage<sup>2</sup>, G. De Guidi<sup>1</sup><sup>1</sup>*Dipartimento di Scienze Chimiche, Università di Catania, Catania, Italy*<sup>2</sup>*Institute Curie, Centre National de la Recherche Scientifique, Orsay, France*

Fluoroquinolones are a class of antibacterial drugs able to photosensitize oxidative damage in DNA. Amongst, Rufloxacin (RFX) photosensitization was studied on biomolecules of increasing complexity: this drug acts by a mechanism mainly via singlet oxygen (type II reaction) (1). This results obtained from simpler models, should provide an excellent start for elucidation of the mechanistic pathways of drug photomediated cell damage.

The phototoxic and photomutagenic potency of RFX are investigated using a panel of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) mutants affected in different DNA repair pathways. Thus, photomutagenicity of RFX are evaluated by measuring the *Can<sup>R</sup>* mutation rate.

Compared to WT (Wild Type) strain, a high increase in mutation frequency in strains affected in *Ogg1* gene are observed, suggesting that oxidized purines, such as 7,8-dihydro-8-oxoguanine (8-oxoG) are formed. A lower increase in mutation frequency occurs in strain affected in other DNA-glycosylases belonging to base excision repair (BER) pathway, showing that other kind of damage are less represented.

Moreover, cell viability test showed that none of the mutants affected in different DNA repair pathways is more sensitive to photosensitization induced by RFX as WT, demonstrating that phototoxic effect on cell starts with primarily substantial membrane damage.

The DNA sequencing analysis of mutation spectrum mediated by RFX plus UVA in WT exhibits a high prevalence of GC > TA transversion, transition and frameshift mutations are less represented.

Taken together, our data demonstrate that photosensitized reaction induced by Rufloxacin can lead to mutagenesis, and suggest that 8-oxoG could be a major damage induced by photosensitization mediated by Rufloxacin, in agreement with the detection of 8-oxoG by HPLC-EC (chromatography with electrochemical detection) observed in photosensitization reaction induced by Rufloxacin in WT yeast (1). Furthermore, the use of yeast strains affected in different DNA repair pathways revealed that BER seems to play a major role in the avoidance of mutation induced by the drug, but other pathways such as translesion synthesis (TLS) and post replication repair (PRR) cannot be excluded.

1. Catalfo et al. Photochem Photobiol Sci  
2007;6(2):181-9

### LA DIAGNOSTICA ALLERGOLOGICA IN VITRO: CONFRONTO DI UNA NUOVA METODICA PER LA DETERMINAZIONE DELLE SIGE ISAC RISPETTO AL SISTEMA IMMULITE 2000

G. Tringali<sup>1</sup>, R. A. Attaguile<sup>1</sup>, G. Belluomo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Ricerca Medica e Ambientale di Acireale (Ct)

Il test Immuno Solid-phase AllergenChip è un metodo altamente innovativo nella diagnostica allergologica che consente una valutazione simultanea di numerose molecole allergeniche, rappresentative delle più comuni fonti allergeniche. La tecnologia consente di passare dall'allergologia degli estratti all'allergologia delle molecole superando i limiti degli attuali test diagnostici. E' stato effettuato un confronto dei risultati positivi con le IgE specifiche eseguite sullo strumento IMMULITE. Il test ISAC prevede l'utilizzo di un biochip che contiene 4 arrays; sono sufficienti 20 µl di siero per paziente, dopo incubazione e breve lavaggio il vetrino è trattato con l'anti-IgE umano fluorescente; infine previo lavaggio si effettua la scansione con un lettore laser confocale a fluorescenza e si ha la stampa del risultato con tre classi di positività. Ogni array contiene fino a 400 spot corrispondenti a 400 allergeni, riuscendo a valutare anche forme di allergopatie verso allergeni che non sono presenti in quantità ottimale nell'estratto usato per eseguire i test di routine.

La nuova diagnostica molecolare valuta le cross-reazioni tra proteine allergeniche e le modalità di consumo di alcuni alimenti base: ad es. si possono studiare meglio le proteine degli acari delle quali la Der p 10.0101 cross-reagisce con i crostacei, i molluschi ed i blattoidei; per l'uovo, l'ovomucoide è una proteina termostabile e quindi l'allergico non può consumare l'uovo neanche dopo cottura (al contrario l'ovoalbumina è termolabile). I risultati della nostra ricerca hanno evidenziato casi in cui, mentre l'allergogramma proteomico dava risultati positivi, la ricerca delle sIgE in alcuni casi non ha rilevato positività. Ciò si è verificato in particolar modo per gli allergeni del cane e del latte. Inoltre 2 casi su 14 di allergia alla pesca (Pru p 3) in soggetti con S.O.A. non sono stati rilevati dall'Immulate. Per gli altri allergeni nel complesso i metodi sono sovrapponibili. Questi sono alcuni dei risultati che grazie all'avvento dell'ingegneria genetica e lo sviluppo delle nanotecnologie hanno modificato la diagnostica allergologica in vitro rendendola più affidabile [Hiller R, Huber M, Schmdt WM et al. Microarrayed allergen molecules: diagnostic gatekeepers for allergy treatment]

### PROTECTIVE EFFECT OF CARNOSINE AND TREHALOSE UNDER PROINFLAMMATORY STRESS CONDITIONS ON iNOS AND PARP EXPRESSION

S. Giliberto<sup>1</sup>, V. Spina Purrello<sup>1</sup>, V. G. Nicoletti<sup>1</sup>, E. Rizzarelli<sup>1</sup>, A. Giuffrida Stella<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dep. of Chemical Sciences, Section of Biochem. and Molec. Biol., Medical Fac., Univ. of Catania

Introduction. Accumulating evidences have indicated relevant protective properties of carnosine and trehalose against many stress conditions. The neuropeptide carnosine ( $\beta$ -alanyl-L-histidine), is involved in many processes of cellular defence such as inhibition of protein cross-linking and glycation, metal chelation, free radicals and NO detoxification (1).

The disaccharide trehalose is produced in large amounts under stress conditions and can counteract protein misfolding and aggregation in neurodegenerative disorders.

In the present study we examined carnosine and trehalose effect against NO induced cell death in primary rat astroglial cell cultures treated with lipopolysaccharide (LPS) and interferon gamma (INF $\gamma$ ), a well known neurotoxic pro-inflammatory condition.

To better understand the molecular mechanism underlying the role of carnosine and trehalose we measured cell viability, nitrite and the LDH release and iNOS and PARP expression.

Materials and methods. Interferon- $\gamma$  (100U/ml) and lipopolysaccharide (LPS 1 µg/ml) were used to induce iNOS dependent stress conditions in primary rat astroglial cell cultures with or without carnosine and trehalose 20mM.

Results and discussion. An increase of LDH and nitrite release and a decrease of cell viability (MTT) after 24 hrs of LPS and INF- $\gamma$  treatment was observed. A dose-response experiment was performed to establish the most protective concentration of carnosine and trehalose. Carnosine and trehalose addition was able to decrease nitrite and LDH release and to increase cell viability in a dose-response manner.

Apart the NO binding activity of carnosine, such effect is also attributable to the observed iNOS and PARP down-regulation by carnosine and trehalose treatment under stress conditions.

A mechanism that affects the pathway of PARP/iNOS induction after LPS-INF $\gamma$  treatment can be hypothesized. The data obtained suggest that, beside the antioxidant role of carnosine and trehalose, these molecules can also modify the iNOS expression pathway. Such hypothesis is under further investigation to better understand such critical step of may neurodegenerative disorders.

Bibliografia

1. Nicoletti V et al, J. of Neuroscience Research 2007;85:2239-45

Aknowlegments research by PRIN 2005 Prot. 2005054147

**CD95/CD95L DISEQUILIBRIUM IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS IN MULTIPLE SCLEROSIS ACTIVE PHASES**

N. Licata<sup>1</sup>, F. M. Salmeri<sup>1</sup>, V. Sofo<sup>1</sup>, E. Palella<sup>2</sup>, P. Bramanti<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dpt of Environmental Protection, University of Messina, Messina

<sup>2</sup>IRCCS Neurolesi Bonino-Pulejo, Messina

**Introduction.** Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory demyelinating disease of central nervous system (CNS). In active disease a transmigration of autoreactive T cells to myelin antigens recruited from the peripheral blood to CNS occurs and contributes to the perpetuation of the inflammation. Our previous study (1) showed a peculiar impaired behaviour of apoptosis receptor complex CD95/CD95L on membrane of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of MS patients: CD95L decreased dramatically while CD95 increased in active disease, instead both receptor and ligand increased in stable disease. The aim of this study was to evaluate mRNA levels and protein expression of CD95/CD95L in PBMC of MS patients to find an eventual correlation with our previous data.

**Methods.** 40 MS patients, 25 stable and 15 active, 14 male and 26 female, aged 15-55 years, were enrolled. 10 aged and sex matched healthy controls were used. PBMC were isolated and resuspended in Trizol reagent for extraction of total RNA. Quality of the extracted RNA was evaluated by formamide/agarose electrophoresis and quantity was determined by spectrophotometer at OD260. Only samples with a ratio  $\geq 1.7$  were used for the successive semiquantitative analysis by reverse transcriptase (RT)-PCR. Proteins were extracted by RIPA buffer, dissolved in 1% SDS and analyzed by spectrophotometer at OD750 using a colorimetric assay. The cell lysates (40  $\mu$ g of protein) were resolved by SDS PAGE and blotted on PVDF membrane. The samples were probing with appropriate primary Ab and beta-actin. The secondary Abs were HRP-conjugated. Signals were detected using ECL system.

**Results and Discussion.** Our results showed high mRNA levels for both CD95 and CD95L in both active and stable patients vs controls. CD95 protein expression confirmed data obtained by RT-PCR in all samples, while CD95L protein dramatically decreased only in active MS patients. These data confirm the impairment on membrane expression previously observed and let us hypothesize that post-transcriptional modifications occur in active phase of disease.

1. Sofo et al: Impairment of membrane markers on peripheral blood mononuclear cells and imbalance of cytokine secretion in the pathogenesis of Multiple Sclerosis active phases. JICR 25,661,2005

**TELEOSTEI BIOINDICATORI NELLA COSTA IONICA SICILIANA**

V. Ferrito<sup>1</sup>, C. Copat<sup>1</sup>, B. Tomasello<sup>1</sup>, V. Pulvirenti<sup>1</sup>, C. Fruciano<sup>1</sup>, C. Tigano<sup>1</sup>, M. Renis<sup>1</sup>, S. Sciacca<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip. Biologia Animale "M. La Greca"

<sup>2</sup>Dip. Chim. Biol., Chim. Med. and Biol. Molecolare

<sup>3</sup>Dip. Anat., Pat. Diagnostica, Med. Legale, Igiene and Sanità Pubblica "G.F. Ingrassia", Università di Catania

E' noto che l'inquinamento causa modificazioni delle condizioni ambientali che si ripercuotono sulla componente biologica, nella quale si possono riconoscere organismi "bioindicatori" dello stato di salute degli ecosistemi. In questo studio abbiamo esaminato come bioindicatori degli ecosistemi acquatici esemplari del Teleosteo *Coris julis* (Linneo 1758) provenienti dal litorale di Augusta (A), interessato da fenomeni di inquinamento industriale, e dal litorale di Riposto (R), come controllo. E' stata valutata la presenza di inquinanti chimici quali: Cd, Cr, Pb e Hg mediante spettrofotometria di assorbimento atomico, IPA tramite HPLC, pesticidi e PCB tramite gascromatografia. Le analisi chimiche sono state condotte sia sul muscolo della specie esaminata, che su campioni di acqua e sedimento delle aree di studio. La presenza di anomalie scheletriche e di micronuclei è stata verificata, rispettivamente, con la tecnica di Dingerkus&Uehler (1977) e di Al-Sabti & Metcalfe (1995). I risultati ottenuti hanno indicato nel sito (A) una concentrazione totale di IPA nelle acque (1,21  $\mu$ g/L) e nei sedimenti (1,388 mg/Kg), e di Cd (5 mg/kg) nei sedimenti, superiore a quella indicata dal Reg.CE 152 (03-04-2006) e dal D.M. 367 (06-11-2003). I valori del bioaccumulo hanno altresì evidenziato la presenza di Hg e Cd rispettivamente nel 37% e 90% degli esemplari in (A); mentre nel sito (R), il Cd è stato rinvenuto in tutti gli esemplari. L'analisi osteologica ha evidenziato cifosi, fusione delle vertebre e malformazioni nelle mascelle faringee nel 17% dei campioni pescati in (A). Infine, è stato riscontrato un significativo incremento di micronuclei nel sito (A) ( $p < 0,05$ ). I nostri risultati sono in accordo con i dati pubblicati in precedenza(1), in cui emerge la presenza di DNA altamente frammentato nei campioni di *C. julis* pescati nel sito (A) rispetto a quelli del sito (R).

In conclusione, sulla base dell'indagine ora svolta, *C. julis* deve essere considerato un valido bioindicatore dello stato di salute degli ecosistemi marini, ed è auspicabile che ulteriori studi condotti sempre con un approccio multidisciplinare, riescano a dare un valido contributo nel biomonitoraggio ambientale.