



PROGRAMMA DI RICERCA STM 2015

-Relazione Scientifica attività di ricerca svolta-

Il Fruitore: **Virginia Protto**

Istituto di afferenza: **Istituto di Farmacologia Traslazionale**

Qualifica: **Borsista**

Titolo del programma:

ProNGF/NGF and the sympathetic regulation of adipose tissue metabolism in woman affected by PCOS and treated with acupuncture.

Obiettivi:

Studiare su campioni di tessuto adiposo mesenterico prelevati da donne affette da Sindrome dell'Ovaio Policistico (PCOS) e trattate con agopuntura, quale siano le alterazioni nella dinamica di maturazione del proNGF in NGF maturo (mNGF) e come tali alterazioni siano modificabili attraverso trattamenti ripetuti con agopuntura.

Descrizione del progetto e dei risultati ottenuti:

Nella sindrome metabolica femminile, oltre ad altre caratteristiche quali lo sviluppo di obesità, resistenza all'insulina, disfunzioni cardiovascolari è presente anche l'aumento dell'attività di base del sistema nervoso simpatico (SNS). Ciò causa iperandrogenismo e sviluppo della sindrome dell'ovaio policistico (PCOS) che è considerata la prima causa di infertilità femminile nel mondo. L'alterata attività del SNS porta anche a disfunzioni del metabolismo del tessuto adiposo, con conseguenze su altri organi e sistemi. Donne obese e affette da PCOS hanno alti livelli ematici di NGF, una neurotrofina ad azione stimolante sul SNS. L'agopuntura, mirata a ridurre il tono del SNS, si è rivelata efficace nel miglioramento clinico della PCOS e nella regolazione della produzione di NGF da parte delle ovaie in modelli animali di PCOS. Il progetto si propone di studiare i meccanismi



della descritta l'efficacia dell'agopuntura sulla regolazione del metabolismo del tessuto adiposo e del SNS in donne affette da PCOS.

E' stato, quindi, studiato l'effetto dell'agopuntura sul contenuto tissutale della neurotrofina NGF, sia nel suo stato di precursore che in quello di proteina matura, su campioni di tessuto adiposo addominale sottocutaneo prelevati da donne affette da PCOS e trattate con agopuntura al fine di determinare come vari il loro rapporto fisiologico rispetto al controllo non patologico e come l'agopuntura riesca a correggere l'eventuale sbilanciamento nel rapporto tra le due forme.

Per poter valutare il contenuto proteico tissutale della neurotrofina NGF, sia nella sua forma immatura che in quella matura, si è iniziato con l'effettuare un'estrazione totale di campioni di tessuto adiposo provenienti da donne di controllo ed affette da PCOS, trattate o meno con agopuntura (18 donne per ciascuno dei gruppi sperimentali).

I campioni sono stati omogeneizzati in 10 volumi di Buffer (20 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 10% Glicerolo, 1 mM EDTA, 20 mM NaF, 30 mM $\text{Na}_4\text{P}_7\text{O}_2$) contenente inibitori per le proteasi e per le fosfatasi. L'omogeneizzazione è stata fatta attraverso l'uso di un omogeneizzatore meccanico (Tissue Lyser Qiagen frequenza: 25 Hz per due minuti). Dopo centrifugazione, è stato isolato con una siringa l'estratto proteico dallo strato di grasso presente nel campione. Infine sono stati aggiunti 5 volumi del Buffer addizionato con detergenti (0.2% SDS, 2% NP-40, 0.5% DOC) e dopo una seconda centrifugazione, il supernatante è stato utilizzato per effettuare saggi di quantificazione proteica attraverso spettroscopia ad infrarossi (Direct Detect® Infrared Spectrometer, Millipore).

Per investigare la modulazione delle dinamiche mNGF/proNGF nelle donne affette da PCOS rispetto ai corrispettivi controlli sani e l'efficacia dell'agopuntura nel ristabilire il rapporto fisiologico di tale rapporto, sono stati effettuati due differenti test ELISA (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay) messi a punto recentemente nel laboratorio CNR di afferenza (Soligo M. et al. *Brain Res.* 2015). Tali test permettono di quantificare rispettivamente il contenuto assoluto di mNGF e proNGF sfruttando la capacità di anticorpi, specificatamente diretti contro la porzione matura o contro la porzione pro della neurotrofina, di riconoscere selettivamente le due forme. Su piastre



ELISA Nunc™ MaxiSorp™ è stato fatto aderire l'anticorpo anti NGF AF-556-NA che, legando un epitopo presente sulla porzione matura del proNGF, è in grado di riconoscere sia il proNGF che l'mNGF. Dopo dodici ore di incubazione, i campioni provenienti dai cinque gruppi sperimentali (donne di controllo, controllo trattate con una singola seduta di agopuntura, donne affette da PCOS, PCOS trattate con una singola seduta di agopuntura e PCOS trattate con agopuntura per cinque settimane) sono stati piastrati sulla fase solida, precedentemente lavata e saturata con PBS più BSA. I campioni sono stati, quindi, incubati per sei ore in agitazione su un piano basculante. A questo punto, piastre gemelle sono state incubate o con l'anticorpo anti NGF 27/21, che specificatamente riconosce la forma matura dell'NGF, oppure con l'anticorpo anti proNGF EP1318Y che, legando un epitopo posto sulla porzione pro, è in grado di immunoreagire esclusivamente con la proneurotrofina ed in special modo con le sue due isoforme non glicosilate pro-A di 34 kDa e pro-B di 25 kDa. Gli anticorpi sono stati lasciati tutta la notte in incubazione quindi sostituiti con gli appropriati anticorpi secondari coniugati ad HRP e lasciati agire per novanta minuti in agitazione in modo da minimizzare il verificarsi di legami aspecifici. Il substrato cromogenico 3',3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) è stato utilizzato per visualizzare la reazione che è stata poi bloccata mediante incubazione con acido cloridico 1N. L'acidificazione fa virare il colore del substrato dal blue al giallo che può poi essere misurato in assorbanza a 450 nm attraverso un lettore ELISA Multiskan.

Come è evidente in figura 1 (pannelli A e B), nonostante non sia apprezzabile una variazione significativa dei contenuti tissutali di mNGF e proNGF nelle donne affette da PCOS (PCOS b) rispetto ai corrispettivi controlli sani (C b), nel tessuto adiposo di donne affette da PCOS trattate con agopuntura, sia in singolo trattamento (PCOS 1t) sia nel trattamento prolungato di cinque settimane (PCOS 5w) si riscontra un significativo decremento della pro-neurotrofina (pannello B) a fronte di una diminuita presenza delle isoforme pro-A e pro-B della neurotrofina stessa. Ciò si riscontra anche nel pannello C, in cui è riportato il ratio mNGF/proNGF, dove si può notare un'alterazione del bilancio mNGF/proNGF a favore della neurotrofina matura, nei soli

campioni “PCOS + agopuntura”, risultando significativo in particolar modo il trattamento acuto con agopuntura (PCOS 1t).

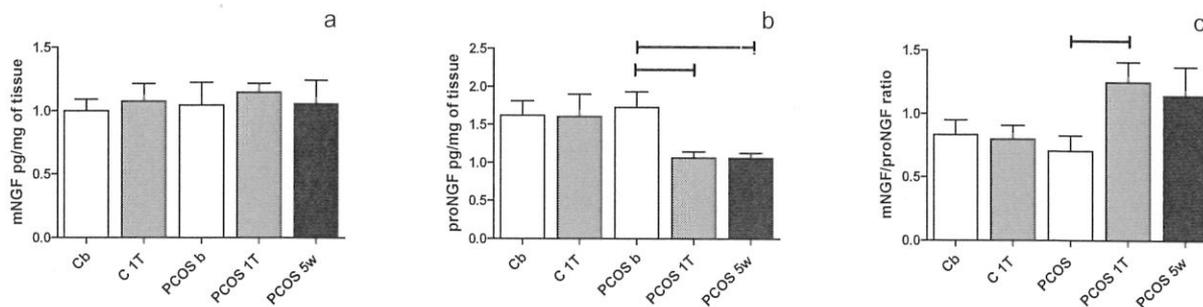


Figura 1. Livelli di mNGF e proNGF in estratti tessuto adiposo provenienti da donne affette o meno da PCOS e trattate o meno con agopuntura. Il contenuto assoluto di mNGF (A) e proNGF (B) è stato valutato mediante test ELISA. (C) Analisi del rapporto mNGF/proNGF. I dati sono espressi come media \pm SEM di pg di NGF/ mg di tessuto totale. One-way ANOVA e Bonferroni post-test, *P<0.05.

Come da programma di ricerca, è stata inoltre iniziata l'analisi, mediante western blot, del contenuto tissutale dei recettori per proNGF (p75^{NTR}/sortilin) e per il mNGF (TrkA). Dati preliminari evidenziano la capacità dell'agopuntura di modulare oltre al bilancio mNGF/proNGF anche l'espressione del recettore p75^{NTR}. Questa ultima parte del lavoro verrà sviluppata in maniera più completa ed approfondita presso il laboratorio CNR di afferenza.

Si può concludere che la patologia non modifica il bilancio fisiologico di mNGF/proNGF, ma che il trattamento con agopuntura altera fortemente i livelli di NGF favorendo uno sbilanciamento del rapporto mNGF/proNGF in senso neurotrofico. Presumibilmente, gli alterati processi di sintesi e maturazione della neurotrofina potrebbero comportare una più abbondante conversione del proNGF in mNGF andando incontro a un fenomeno di compensazione del segnale apoptotico/neurotrofico.

Li, 21 ottobre 2015

Firma del Proponente

Firma del Fruitore