



## PROGRAMMA DI RICERCA STM 2015

-Relazione Scientifica attività di ricerca svolta-

Il Fruitore: **Marzia Soligo**

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

Qualifica: **ricercatore III livello**

*Titolo del programma:*

**proNGF/NGF production by placenta in a rat model of prenatal androgenization.**

*Obiettivi:*

Studiare, su campioni di placenta prelevati da ratte partorienti trattate con testosterone durante la gravidanza, quale siano le alterazioni nel bilancio tra proNGF ed NGF maturo (mNGF) e come tali alterazioni siano modificabili attraverso trattamenti ripetuti con elettroagopuntura (EA).

*Descrizione del progetto e dei risultati ottenuti:*

L'eccesso di androgeni materni diminuisce il volume e la funzionalità della placenta, con conseguenze sui feti. La prole femminile adulta di ratte androgenizzate risulta predisposta allo sviluppo della sindrome metabolica e allo sviluppo della sindrome dell'ovaio policistico (PCOS), con conseguente aumento dell'infertilità. L'alterata steroidogenesi placentare può essere correlata ad alterazioni nell'attività del sistema nervoso simpatico (SNS) e ad un alterato metabolismo della neurotrofina NGF. L'NGF viene sintetizzato come proneurotrofina, proNGF, e successivamente maturato in mNGF per effetto di proteasi intra- ed extra-cellulari. Il proNGF e l'mNGF, attraverso il legame a specifici complessi recettoriali (TrkA o p75<sup>NTR</sup>/sortilin), esercitano un ruolo biologico contrapposto che spinge la cellula verso la morte, l'uno, oppure verso la sopravvivenza, l'altro.



L'agopuntura, mirata a ridurre il tono del SNS, si è già rivelata efficace nella modulazione centrale e periferica del metabolismo e nell'attività di proNGF/mNGF.

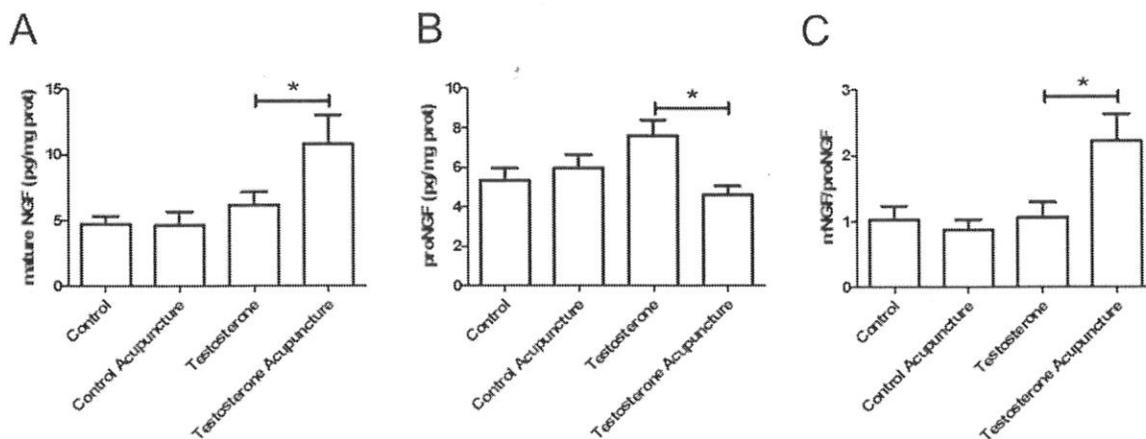
E' stato, quindi, studiato l'effetto dell'EA sul contenuto tissutale della neurotrofina NGF, sia nel suo stato di precursore che in quello di proteina matura, su campioni di placenta prelevati da ratte partorienti trattate con testosterone durante la gravidanza al fine di determinare come vari il loro rapporto fisiologico nella placenta androgenizzata rispetto al controllo non patologico e come l'EA 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 placenta provenienti da ratte partorienti di controllo ed androgenizzate trattate o meno con EA (nove ratte per ciascuno dei quattro gruppi sperimentali). I campioni sono stati omogeneizzati in 50 volumi di RIPA buffer (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton, 0.5 % DOC, 5 mM EDTA) contenente inibitori per le proteasi e per le fosfatasi. L'omogeneizzazione è stata condotta in ghiaccio utilizzando un omogeneizzatore manuale in vetro e gli estratti sono stati successivamente sonicati. Dopo 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 ratte androgenizzate rispetto ai corrispettivi controlli sani e l'efficacia dell'EA 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'NGF. Dopo dodici ore di incubazione, i campioni provenienti dai quattro gruppi sperimentali (ratti di controllo, controllo



trattati con EA, PCOS e PCOS trattati con EA) 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.



**Figura 1.** Livelli di mNGF e proNGF in estratti di placenta di ratte gravide androgenizzate trattate o meno con EA. 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 proteina totale. One-way ANOVA e Bonferroni post-test, \*P<0.05.



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 ratte androgenizzate (testosterone) rispetto ai corrispettivi controlli sani (control), nei tessuti di placenta di ratte partorienti androgenizzate trattate con elettroagopuntura (testosterone acupuncture) si riscontra un significativo incremento della neurotrofina matura (pannello A) a fronte di una diminuita presenza delle isoforme pro-A e pro-B della neurotrofina stessa (pannello B). Nel pannello C, in cui è riportato il ratio mNGF/proGF, è evidente come nei soli campioni "testosterone acupuncture" si verifichi un'alterazione del bilancio mNGF/proNGF e come tale bilancio sia a favore della neurotrofina matura.

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

Per concludere, l'androgenizzazione, indotta in ratte gravide mediante somministrazione di testosterone, non modifica il bilancio fisiologico di mNGF/proNGF, poiché presumibilmente non incide sui processi di sintesi e maturazione della proteina stessa. Di contra, il trattamento con EA altera fortemente i livelli di NGF favorendo uno sbilanciamento del rapporto mNGF/proNGF in senso neurotrofico. Si può speculare che ciò avvenga, non solo per gli accresciuti livelli di sintesi proteica quanto per un più efficace meccanismo di maturazione che favorisce una più abbondante conversione del proNGF in mNGF.

Li, 16 settembre 2015

Firma del Fruitore