



DOTTORATO INTERNAZIONALE  
IN NEUROFARMACOLOGIA

Anno IV. Numero 2.  
Aprile - Giugno 2010  
Rivista trimestrale on-line

# IL PROMETEO



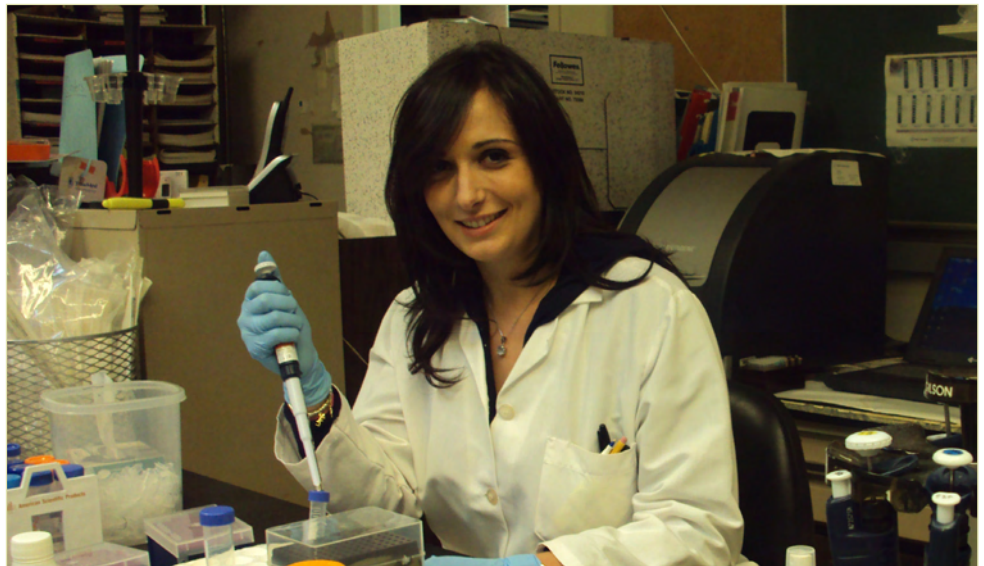
Bollettino di Dottorato

Direttore: Prof. Filippo Drago

## TITOLO: "RUOLO DELL'EME OSSIGENASI NEI PROCESSI RIPARATIVI DELLA CORNEA"



DOTTORATO  
INTERNAZIONALE  
IN  
NEUROFARMACOLOGIA



*Giuseppina Letizia Marrazzo*

Università degli Studi di Catania

Dipartimento di Farmacologia

Sperimentale e Clinica

Viale Andrea Doria, 6-Catania

Tel.: 095.7384236

[il\\_prometeo@email.it](mailto:il_prometeo@email.it)

<http://www.unict.it/dfsc>

**D**opo circa un anno e mezzo trascorso nei laboratori del Dipartimento Chimica Biologica, Chimica Medica e Biologia Molecolare nel gruppo di ricerca del Professor Li Volti, ho avuto la possibilità di trascorrere un periodo di formazione all'estero presso i laboratori di farmacologia del New York Medical College sotto la supervisione della Prof.ssa Michal Laniado Schwartzman. Dopo otto mesi di lavoro negli USA riporto le mie impressioni su questa esperienza professionale. Il gruppo di ricer-

ca della Prof.ssa Schwartzman da anni studia l'evoluzione dei processi infiammatori nella cornea e quanto gli enzimi della famiglia dell'eme ossigenasi siano implicati in questi processi. La cornea è la porzione anteriore della tonaca fibrosa dell'occhio, è sprovvista di vasi sanguigni sulla sua superficie anteriore e riceve il suo nutrimento dalle anse vascolari del limbus. Dalla parte interna, l'endotelio corneale riceve nutrimento dall'umor acqueo contenuto nella camera anteriore. Data la sua particolare colloca-

zione anatomica, la cornea è esposta ad insulti di vario genere. L'eventuale danno provoca una risposta infiammatoria, caratterizzata dall'attivazione delle cellule corneali residenti e dal reclutamento di leucociti che inducono la produzione di mediatori lipidici e proteici tipici del processo infiammatorio. Pertanto, l'aberrante attivazione di questi percorsi metabolici può indurre: degenerazione tissutale, ulcerazioni, neovascolarizzazione e nei casi più gravi perdita delle facoltà visive legate ad opacizzazione.

A mantenere l'omeostasi a livello corneale e per far sì che questa possa mantenere la propria funzionalità e trasparenza, esistono dei "self-resolving processes" che lavorano in concerto per bilanciare effetti pro- e anti- infiammatori. Poco è conosciuto sui pathway protettivi e antinfiammatori endogeni che agiscono in concerto per mantenere l'omeostasi e quindi promuovere la risoluzione a seguito di un eventuale danno. Negli ultimi anni è stato verificato che il sistema dell'eme ossigenasi [eme ossigenasi-1 (HO-1) ed eme ossigenasi-2 (HO-2)], enzimi microsomiali che catalizzano la degradazione ossidativa dell'eme a biliverdina, monossido di carbonio (CO) e ferro, svolgono una fondamentale attività endogena citoprotettiva e rispondono prontamente agli stress infiammatori in molti tessuti dell'organismo. In particolare, l'HO-2 risulta essere costitutivamente espresso, mentre l'HO-1 è inducibile, viene sintetizzato in risposta a stimoli di stress (metabolici, fisici o ambientali) e la sua attività di degradazione dell'eme a CO e bilirubina tende a ridurre il danno tissutale con una significativa riduzione della cascata degli eventi infiammatori come migrazione ed adesione leucocitaria e produzione di citochine pro-infiammatorie. Il ruolo protettivo dell'eme ossigenasi a livello della cornea era praticamente sconosciuto fino a quando il gruppo della Prof.ssa Schwartzman non ha deciso di intraprendere un percorso in grado di delucidare il significato biologico di questo enzima. In particolare i nostri studi si sono focalizzati sulla via biosintetica del citocromo P450 isoforma 4B1 che sembrerebbe avere un ruolo critico nel mediare l'infiammazione a livello della superficie oculare. La superfamiglia del citocromo P450 è un gruppo ampio e diversificato di enzimi. La funzione della maggior parte degli enzimi CYP è quello di catalizzare l'ossidazione di sostanze organiche. In particolare, il citocromo P450 4B1 è una proteina che nell'uomo è codificata dal gene CYP4B1 e risulta essere largamente espressa a livello della cornea. Questo enzima metabolizza l'acido arachidonico sintetizzando principalmente due metaboliti: l'acido 12 (R)-idrossi-5,8,10,14-icosatetraenoico [12 (R)-HETE], un potente inibitore dell'attività ATPasica e l'acido 12 (R)-idrossi-5,8,14-icosatrienoico [12 (R)-HETrE], con marcate proprietà vasodilatatorie e angiogeniche. Nello specifico, il 12-HETrE risulta essere uno dei principali responsabili del processo infiammatorio e angiogenico a livello corneale. Lo dimostra il fatto che l'inibizione della sua sintesi attenua fortemente l'infiammazione in vivo. Alla luce di questi risultati, abbiamo indirizzato i nostri esperimenti sulla comprensione di quella che è la biochimica di questi eventi includendo, le reazioni enzimatiche che portano alla produzione di 12-HErTE e

i meccanismi cellulari che mediano la sua attività nella risposta infiammatoria.

I nostri studi hanno confermato che questo pathway è intrinseco alla risposta infiammatoria e ricopre un ruolo chiave nel mediare l'infiammazione e la neovascolarizzazione della superficie oculare in risposta al danno.

I nostri dati preliminari dimostrerebbero che l'induzione dell'eme ossigenasi attenua fortemente il processo infiammatorio e la neovascolarizzazione in modelli di danno corneale di topo e coniglio. Questo effetto risulta essere strettamente correlato con una ridotta produzione del derivato della via metabolica del CYP4B1, il 12-HErTE.

In particolare, i risultati ottenuti dimostrerebbero che:

- 1) l'HO-2 risulta essere costitutivamente espressa sia su modelli di tessuto sano che su modelli di tessuto danneggiato;
- 2) il danno indotto a livello corneale induce rapidamente ed in maniera marcata l'espressione dell'HO-1 incrementando l'attività enzimatica;
- 3) una ridotta attività enzimatica, riscontrabile in modelli animali knock out per l'HO-2, sta alla base di una risposta infiammatoria esagerata legata ad un'over-espressione di una serie di proteine infiammatorie e chemochine come MIP-2 e MCP-1, mancata cicatrizzazione, ulcerazione, perforazione e persistente neovascolarizzazione;
- 4) inoltre una mancanza di HO-2 è associata ad un'incapacità a livello cellulare di upregolare l'espressione dell'HO-1;
- 5) il trattamento con bilirubina o donatori di CO (entrambi metaboliti dell'eme ossigenasi) può ridurre l'eccessiva neovascolarizzazione nei topi knock out per l'HO-2 durante la risposta infiammatoria.

I nostri prossimi esperimenti sono diretti a confermare che l'attività eme ossigenasica è necessaria per la migrazione delle cellule epiteliali corneali. I meccanismi con cui l'HO contribuisce alla migrazione cellulare in risposta al danno potrebbero risiedere nelle proprietà citoprotettive del CO e della biliverdina.

A concentrazioni fisiologiche la biliverdina è un potente ed efficiente scavenger di specie reattive dell'ossigeno mentre il CO contribuisce in modo sostanziale alla guarigione sopprimendo citochine pro-infiammatorie e chemochine e aumentando l'espressione di mediatori anti-infiammatori quali l'interleuchina-10.

Infine, desidero aggiungere che questa esperienza mi ha aiutata a crescere professionalmente, scientificamente e personalmente, grazie alla possibilità di lavorare e confrontarmi con persone di diverse etnie e culture. Inoltre mi ha aiutata a migliorare il mio inglese (elemento da non sottovalutare).

Per questo i miei più sentiti ringraziamenti sono rivolti al Prof. Filippo Drago, al Prof. Giovanni Li Volti e infine alla Prof.ssa Schwartzman che mi ha accolta nei suoi laboratori e mi segue amorevolmente nella mia crescita scientifica.

*Giuseppina Letizia Marrazzo*



## Behavioral and neurochemical effects of saredutant, a tachykinin NK2 receptor antagonist, in rats subjected to acute restraint stress

Tamburella A., Salomone S., Micale V., Leggio G.M., Navarria A., Cicerata V., Drago F.

University of Catania, Department of Experimental and Clinical Pharmacology, Catania, Italy

Increasing evidence suggests that depression is associated with structural impairments as well as disruption in cellular mechanisms governing neuronal plasticity. The exposure to acute or chronic stressors is followed by hippocampal atrophy, due to the activation of hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis with down-regulation of neurotrophic and/or antiapoptotic factors, which are counteracted by antidepressant treatment (Warner-Schmidt and Duman, 2006). Growing evidences are confirming that  $\beta 3$  adrenoceptors may represent a potential target in the treatment of mood disorders. It has been demonstrated that the activation of this receptor subtype following administration of the agonist amibegron (SR58611A), exerted both anxiolytic and antidepressant effects in behavioral animal models (1). It is well accepted that antidepressant treatment blocks both the stress-induced atrophy and stimulates the neurogenesis in hippocampus, a brain region involved in emotional processes, increasing the expression of the transcriptional factor cAMP-response element binding protein (CREB) and of neurotrophic factors, such as the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (2). Also antiapoptotic factors, such as the B cell-lymphoma-2 (Bcl-2), play an important role in stress-induced degeneration of hippocampal neurons. Bcl-2 is also involved in the mechanism of action of antidepressants, since it has been seen a hippocampal over-expression of this protein following chronic but not acute antidepressant treatment (3). Novel strategies for the treatment of depressive illness include compounds acting at the tachykinin receptor system (Griebel, 1999; Holmes et al., 2003). Compounds acting at the NK2 receptor subtype have been demonstrated to exert antidepressant- and anxiolytic-like properties in animal models (Consoli et al., 2005; Micale et al., 2008).

The present experiment was made to assess the possible antidepressant effect of the NK2 receptor antagonist saredutant amibegron in male rats of Wistar strain tested in the forced swim test (FST), an experimental model widely used for preclinical studies on novel antidepressant drugs. The open field test (OFT) was performed to make sure that the antidepressant activity of the compound was not secondary to an increase of locomotor activity. An experimental model widely used for preclinical studies on novel antidepressant drugs. Furthermore, the hippocampal expression of CREB, BDNF and Bcl-2/Bax ratio proteins was evaluated by Western Blot analysis. Wistar rats were injected/received acutely or chronically (once a day for 7 days), intraperitoneally (i.p.) injection of with saredutant amibegron (1, 5 and 10 mg/kg), tricyclic antidepressant (TCA) clomipramine (50 mg/kg), the selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) citalopram (15 mg/kg) or vehicles, respectively. The influence of stress-related conditions was studied in rats subjected to the acute (4 h) or repeated (4 h/day for 7 days) restraint stress, made prior to the pretest of the FST procedure. Both acute application of and repeated restraints stress produced an increased procedure increased the immobility time and a decreased swimming time in FST, considered as index of "depressive-like behavior" ( $p < 0.05$ ;  $p < 0.01$ ), in vehicle and SR58611A (1mg/kg/day) injected stressed animals in comparison to control NST group ( $p < 0.05$ ). Furthermore, rats showed lower hippocampal BDNF and Bcl-2/Bax ratio proteins level expression in control stressed animals compared to the control non-stressed NST group ( $p < 0.05$ ;  $p < 0.01$ ). Opposite effect was in contrast found in CREB expression, since it was reduced and/or increased higher after acute and/or repeated stress procedure, respectively. Both acute and repeated administration of saredutant amibegron (5 and 10 mg/kg) decreased/decreased the immobility time and increased the swimming time both under basal conditions and after stress-related condition exposure ( $p < 0.001$ ). In non-stressed animals, amibegron (10 mg/kg) increased hippocampal expression of BDNF and CREB proteins ( $p < 0.05$ ) as well as of BDNF and Bcl-2/Bax ratio ( $p < 0.05$ ;  $p < 0.01$ ) after acute or repeated treatment, respectively. Furthermore, it was able to counteract the stress-induced dysregulation of hippocampal BDNF expression ( $p < 0.001$ ). No differences were found in the OFT, neurotrophic and antiapoptotic factors. Different results were obtained by clomipramine or citalopram treatment. These results suggest us that the NK2 receptor could represent a new therapeutic target for the treatment of stress-related disorders as depression. It is possible that the behavioral effects of amibegron could be also due to its action on the hippocampal neurotrophic and/or anti-apoptotic factors expression, supporting the hypothesis that the pharmacological stimulation of  $\beta 3$  adrenoceptor may be a therapeutic target for the treatment of stress-related disorders.



## Programma Scientifico

### Saturday, July 10, 2010

10.30-11.15 Registration

11.15-11.30 Opening remarks  
Filippo Drago (Catania)

11.30-12.30 **Opening lecture** (introduced by Filippo Drago)  
**Depression in schizophrenia: new perspectives for the treatment**  
Stuart Montgomery (London)

12.30-13.00 Welcome reception

Parco degli Aragonesi Hotel - Viale Kennedy, 2 (Catania)

**Psychotic disorders: epidemiology and genetics**

Moderator: Alessandro Rossi (L'Aquila)

16.00-17.00 Psychotic disorders: epidemiology and risk factors  
Mauro Carta (Cagliari)

17.00-18.00 The genetics of bipolar spectrum disorders  
Alessandro Serretti (Rome)

18.00-18.30 Discussion

18.30-19.30 Genetics of schizophrenia: new insights from new approaches  
Massimo Gennarelli (Brescia)

19.30-19.40 Questionnaire

### Sunday, July 11, 2010

**Schizophrenia: animal models**  
Introduced and moderated by Marco Riva (Italy)

10.00-11.00 Overview on animal models of schizophrenia  
Josè Borrell (Spain)

11.00-12.00 Neural basis of psychosis-related behaviour in the infection model of schizophrenia  
Joram Feldon (Switzerland)

12.00-12.30 Discussion

12.30-13.30 Sponsored lecture

**Schizophrenia: from diagnosis to long-term treatment**  
Introduced and moderated by Claudio Mencacci (Italy)

16.00-17.00 Factors affecting long-term outcome in schizophrenia  
Alessandro Rossi (Italy)

17.00-18.00 Treatments affecting long-term outcomes in schizophrenia  
Roberto Cavallaro (Italy)

18.00-18.30 Discussion

18.30-19.30 **Special Lecture:**  
**Neurodegeneration in Schizophrenia: implications for the treatment**  
Hilleke Hulshoff Pol (The Netherlands)

19.30-19.40 Questionnaire

### Monday, July 12, 2010

**Neurobiology of schizophrenia**  
Introduced and moderated by Giorgio Racagni (Italy)

10.00-11.00 Glutamatergic system in the pathogenesis of schizophrenia

Marco Riva (Italy)

11.00-12.00 Metabotropic glutamate receptors as new therapeutic targets for the treatment of schizophrenia

Ferdinando Nicoletti (Italy)

12.00-13.00 Cholinergic system in schizophrenia

Giancarlo Pepeu (Italy)

13.00-13.30 Discussion

**Cognitive function in schizophrenia: new insights**

Introduced and moderated by Giovanni Biggio (Italy)

16.00-17.00 Cognitive dysfunctions as endophenotypes of schizophrenia: neurobiological correlates

Silvana Galderisi (Italy)

17.00-18.00 Cognitive impairment and long-term outcome in schizophrenia

Eugenio Aguglia (Italy)

18.00-18.30 Discussion

18.30-19.30 **Special Lecture:**

Cognitive effects of antipsychotic drugs

Michael Davidson (Israel)

19.30-19.40 Questionnaire

## Tuesday, July 13, 2010

**Drug discovery in schizophrenia**

Introduced and moderated by Pier Luigi Canonico (Italy)

10.00-11.00 Searching for new pharmacological targets in schizophrenia

Andrea De Bartolomeis (Italy)

11.00-12.00 New approaches for antipsychotic drug development

Luca Pani (Italy)

12.00-12.30 Discussion

12.30-13.30 Sponsored lecture

**Pharmacological treatment of schizophrenia**

Introduced and moderated by Mauro Mauri (Italy)

16.00-17.00 Second-generation versus first-generation antipsychotic drugs for schizophrenia: which evidence ?

Edoardo Spina (Italy)

17.00-18.00 Neuroimaging and response to treatment with antipsychotics in schizophrenia

Alessandro Bertolino (Italy)

18.00-18.30 Discussion

18.30-19.30 **Special Lecture:**

Subjective well-being and quality of life under antipsychotic treatment

Dieter Naber (Germany)

19.30-19.40 Questionnaire

## Wednesday, July 14, 2010

**Safety of antipsychotics: from pre-clinical evidence to regulatory restrictions**

Introduced and moderated by Dieter Naber (Germany)

10.00-11.00 Cardiovascular risks of antipsychotic treatment

Milou-Daniel Drici (France)

11.00-12.00 Antipsychotic drugs and the risk of cerebrovascular events: which evidence ?

Emilio Sacchetti (Italy)

12.00-12.30 Discussion

12.30-13.30 Sponsored lecture

**Bipolar disorder: from diagnosis to long-term treatment**

Introduced and moderated by Edoardo Spina (Italy)

16.00-17.00 Bipolar depression: diagnostic guidelines and treat-

ment options

Mauro Mauri (Italy)

17.00-18.00 Mixed states: clinical subtyping and implications for the treatment

Athanasios Koukopoulos (Italy)

18.00-18.30 Discussion

18.30-19.30 **Special lecture:**

Treating mania and managing long-term treatment of bipolar disorder

Siegfried Kasper (Austria)

19.30-19.40 Questionnaire

## Thursday, July 15, 2010

**Bipolar disorder: neurobiology and neuropharmacology**

Introduced and moderated by Siegfried Kasper (Austria)

10.00-11.00 Neurobiological trait abnormalities in bipolar disorder

Sophia Frangou (United Kingdom)

11.00-12.00 Molecular mechanisms underlying mood stabilizers efficacy: lessons from lithium

Robert Belmaker (Israel)

12.00-12.30 Discussion

12.30-13.30 Sponsored lecture

**Psychosis in neurological disorders: from diagnosis to treatment**

Introduced and moderated by Giovanni Gambassi (Italy)

16.00-17.00 Psychotic disorders in epilepsy: etiology, clinical features, and therapeutic implications

Riccardo Torta (Italy)

17.00-18.00 Psychosis in Parkinson's disease : from diagnosis to treatment

Mario Zappia (Italy)

18.00-18.30 Discussion

18.30-19.30 Treatment of behavioural and psychological symptoms of dementia: which strategies?

Peter De Deyn (Belgium)

19.30-19.40 Questionnaire

## Friday, July 16, 2010

**Use of antipsychotics in special populations**

Introduced and moderated by Donatella Marazziti (Italy)

10.00-11.00 Use of antipsychotics in children and adolescents: assessing efficacy and safety

Alessandro Zuddas (Italy)

11.00-12.00 Efficacy and safety of antipsychotics in the elderly: which evidence ?

Giovanni Gambassi (Italy)

12.00-12.30 Discussion

12.30-13.30 Sponsored lecture

**Psychotic disorders and comorbidity**

Introduced and moderated by Joseph Zohar (Israel)

16.00-17.00 Pseudoneurotic psychosis: behind the mask

Giovanni Muscettola (Italy)

17.00-18.00 Comorbid substance use disorders in psychoses

Massimo Clerici (Italy)

18.00-18.30 Discussion

18.30-19.30 **Special lecture**

Schizo-obsessive disorder: clinical characteristics and treatment

Abraham Weizman (Israel)

19.30-19.45 Closing remarks

Filippo Drago (Italy)

19.45-19.55 Questionnaire