



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA**  
**DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE, BIOLOGICHE,**  
**FARMACEUTICHE E AMBIENTALI**

Alla cortese attenzione della

Prof.ssa Daniela Rupo

Direttore Generale

Università degli Studi di Messina

Si trasmette, come richiesto nella nota di protocollo n. 32029 del 26/04/18, il progetto di Ricerca relativo all'utilizzo del residuo contabile per il "progetto BIAM-EPI", pari ad euro 301.204,65, con allegato budget suddiviso in voci COAN.

Distinti saluti

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'G. P.' or similar, written in a cursive style.

**Relazione per prosecuzione progetto PON01\_02512**

Nel progetto “*Ricerca e Sviluppo di bioregolatori attivi sui meccanismi epigenetici di processi infiammatori in malattie croniche e degenerative (BIAM-EPI) (PON01\_02512)*”, CUP J41H11000090005, sono stati sviluppati bioregolatori attivi sui processi d'infiammazione cronica, low-grade inflammation e neuroinfiammazione. I bioregolatori sono stati sviluppati da molecole naturali o trasformate mediante tecnologie chimico-fisiche, a partire da Aliamidi talvolta associate a polifenoli. Le Aliamidi, molecole lipidiche endogene, hanno la specificità di contrastare i processi infiammatori modulando vari fattori di trascrizione genica. I polifenoli sono molecole normalmente presenti in alimenti consumati giornalmente. Obiettivo finale del progetto è stato quello di poter disporre di bioregolatori con idonee formulazioni, biodisponibili e ben tollerati dall'organismo per poter effettuare interventi terapeutici innovativi mirati a contrastare l'infiammazione cronica, la low-grade inflammation o la neuroinfiammazione considerati importanti fattori di rischio per lo sviluppo di malattie croniche e degenerative. A tale scopo sono state utilizzate quali bioregolatori le Aliamidi. Il capostipite delle Aliamidi, la Palmitoiletanolamide (PEA), somministrata esogenamente down-regola l'attività delle cellule mastocitarie e l'attività microgliale, esplicando un effetto antinfiammatorio ed antidolorifico. Le Aliamidi sono talvolta associate a polifenoli, molecole che proteggono il DNA dal danno ossidativo e attivano i sistemi protettivi dell'epigenoma. Le ricadute applicative dei bioregolatori oggetto di studio riguardano sia patologie associate a processi infiammatori conclamati quali le malattie infiammatorie croniche, ma anche condizioni caratterizzate da uno stato infiammatorio latente e per questo finora non trattate o trattate con terapie inadeguate; questi stati patologici sono associati quasi sempre al dolore neuropatico, a condizioni che comportano un elevato impatto negativo sulla qualità della vita dei pazienti ed un notevole onere sul piano economico e sociale. Altro importante bersaglio terapeutico dei bioregolatori è rappresentato dalle malattie neurodegenerative del Sistema Nervoso Centrale che, come noto, sono accompagnate da processi neuroinfiammatori cronici indotti e sostenuti da stipiti cellulari gliali; pertanto i bioregolatori assumono potenzialità di farmaci multifunzionali e pleiotropici in grado di intervenire farmacologicamente con meccanismi di modulazione rispettosi del fisiologico biochimismo regolatorio cellulare.

Il progetto BIAM-EPI è stato articolato in 4 differenti workpackages (WP).

La nostra attività di ricerca si è concentrata in particolar modo nei WP2 e WP3.

Il WP2 è stato finalizzato alla valutazione e caratterizzazione dell'effetto prodotto dai bioregolatori in modelli biologici *in vitro* ed *in vivo* che riproducono condizioni d'infiammazione cronica e low grade inflammation in distretti periferici. Le attività afferenti al WP2 hanno infatti permesso di individuare quelli che sono i bioregolatori attivi sui vari distretti studiati individuando il meccanismo d'azione ed in particolare di evidenziare la relazione tra attività antiinfiammatoria e regolazione della trascrizione genica. Nel WP3 si è proceduto ad identificare e caratterizzare bioregolatori attivi sui processi di neuroinfiammazione nel SNC in modelli sperimentali di ischemia cerebrale, malattia di Parkinson,



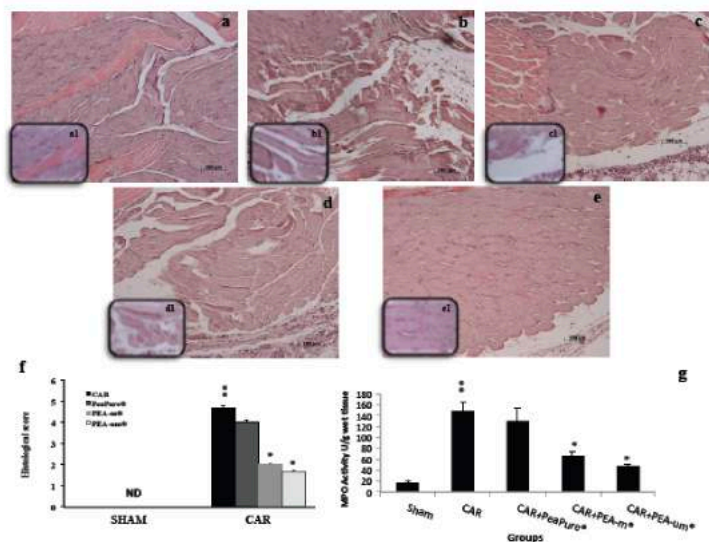
Sclerosi Multipla ed Autismo. Nell'ambito del progetto PON sono stati pubblicati più di 10 lavori su riviste scientifiche ad elevato impact factor; inoltre, tra i brevetti a titolarità Epitech (capofila del progetto) inseriti nel PON01\_02512, il Prof Cuzzocrea risulta coinventore dei due brevetti riportati in tabella:

Bioregolatore	Codice Brevetto	Domanda Deposito
PEA-Oxa	PCT/IT2012/000050	Internazionale
	Acta N° 20130100461	Argentina
	2012327209	Australia
	EP12716671.8	EU
PEA-SYL	MI2013A001132	IT
	EP2821083	EU

L'efficacia delle diverse formulazioni della Palmitoiletanolamide (PEA) (micronizzata PEA<sub>m</sub>/ultramicronizzata PEA<sub>um</sub>) e' stata valutata in un modello sperimentale di edema della zampa indotto dalla somministrazione intraplantare di Carragenina (CAR) nel ratto. Le formulazioni della PEA<sub>m</sub> e PEA<sub>um</sub> hanno mostrato un'efficacia maggiore rispetto alla PEA non micronizzata (PeaPure) se somministrate per via orale attraverso l'analisi dei seguenti end-points:

- Danno istologico
- Infiltrazione neutrofilica (attività della mieloperossidasi MPO)
- Edema della zampa attraverso la misura del volume
- -Iperalgesia

Il trattamento per via orale della PEA micronizzata/ultramicronizzata (10mg/kg) riduce il danno istologico e l'aumento dell'infiltrazione neutrofilica (MPO) indotti dalla somministrazione di CAR (Fig. 1).



**Fig. 1: Effetto del trattamento orale con PEA-m/PEA-um sul danno istologico ed MPO**



La misura del volume dell'edema della zampa e' stato valutata attraverso un time course dopo la somministrazione di CAR. La PEA-m e la PEA/um somministrate per via orale mostrano un'efficacia superiore rispetto alla PeaPure. La somministrazione intraperitoneale della PEA non ha mostrato nessuna differenza tra le diverse formulazioni di PEA testate (Fig.2).

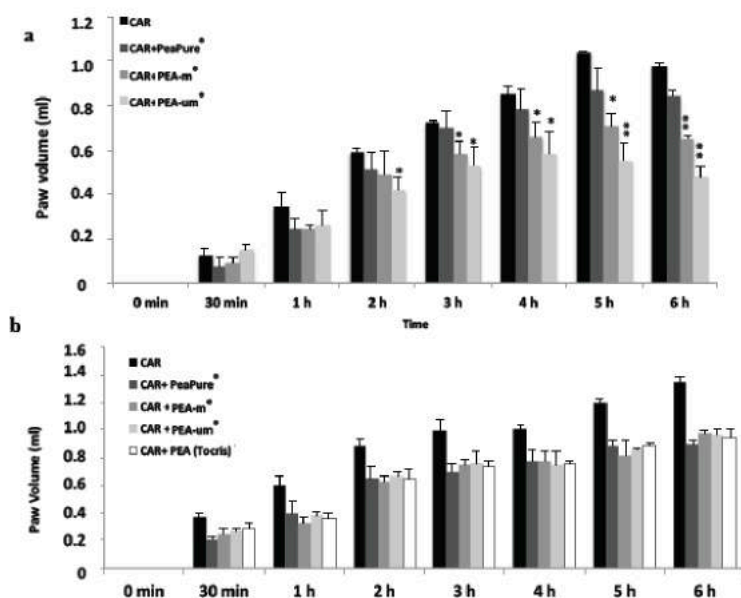
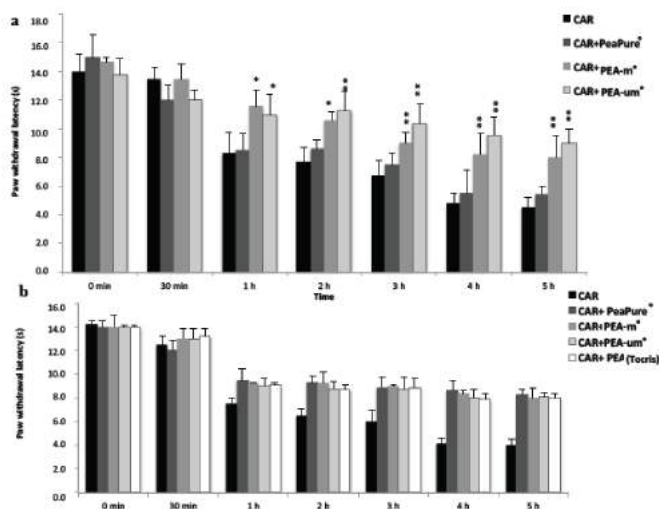


Fig. 2: Effetto delle diverse formulazioni di PEA sulla misura dell'edema della zampa indotto da CAR. (a, per via orale; b, per via intraperitoneale).

L'iperalgnesia e' stata valutata attraverso un time course dopo la somministrazione di CAR. I risultati ottenuti sono stati correlati con quelli ottenuti per la misura del volume. La PEA-m e la PEA/um somministrate per via orale mostrano un'efficacia superiore rispetto alla PeaPure. La somministrazione intraperitoneale della PEA non ha mostrato nessuna differenza tra le diverse formulazioni di PEA testate (Fig.3).



**Fig. 3:** Effetto delle diverse formulazioni di PEA sull'iperalgia indotta da CAR. (a, per via orale; b, per via intraperitoneale).

I risultati di questo studio sono stati oggetto della seguente pubblicazione scientifica:

*Micronized/ultramicronized palmitoylethanolamide displays superior oral efficacy compared to nonmicronized palmitoylethanolamide in a rat model of inflammatory pain.*

*Impellizzeri D, Bruschetta G, Cordaro M, Crupi R, Siracusa R, Esposito E, Cuzzocrea S.*

*J Neuroinflammation. 2014 Aug 28;11:136. doi: 10.1186/s12974-014-0136-0. Erratum in: J Neuroinflammation. 2016;13(1):129.*

In questa fase del progetto si è continuato a valutare l'efficacia del trattamento con il lead compound PEALut (palmitoiletanolamide e luteolina) nel modello sperimentale di trauma vertebro midollare per meglio comprendere il meccanismo d'azione attraverso cui agisce la PEALut.

Abbiamo valutato l'efficacia della PEALut analizzando i seguenti endpoints:

- Neurogenesi
- espressione di fattori trofici

Il trattamento con PEALut si è dimostrato in grado di stimolare la proliferazione di progenitori neuronali, come dimostrato dall'espressione e dal numero di cellule BrdU+, che dei neuroni maturi, marcati selettivamente con il marker Doublecortin (Fig.4)

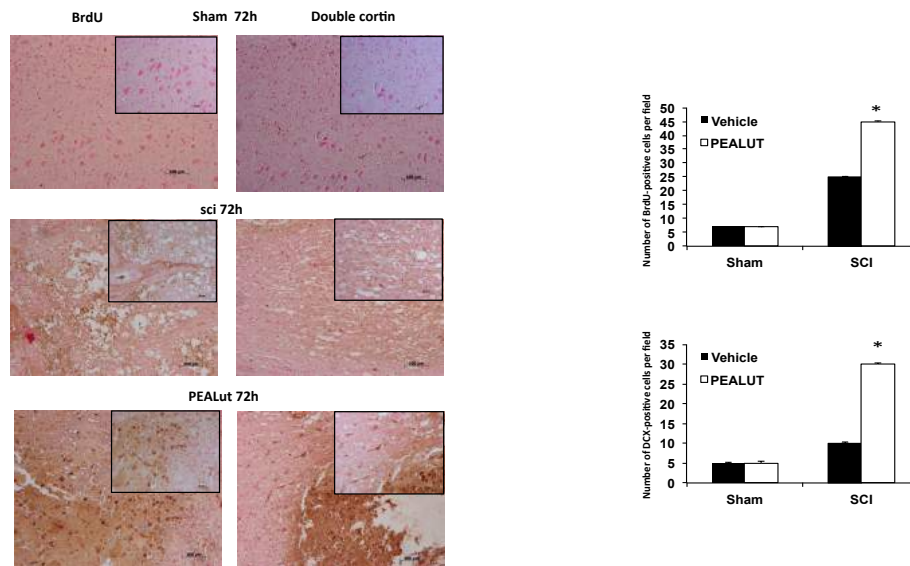


Fig. 4: Effetto del trattamento con PEALut sull'induz

I risultati ottenuti dimostrano che il trattamento espressione dei fattori neurotrofici (BDNF, GDFN, NGF ed NT3), espressione che si era significativamente ridotta dopo induzione del trauma vertebro midollare (Fig.5).

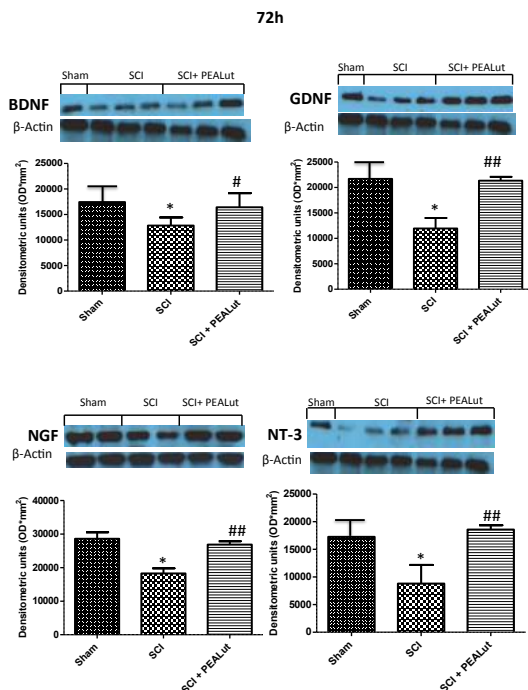
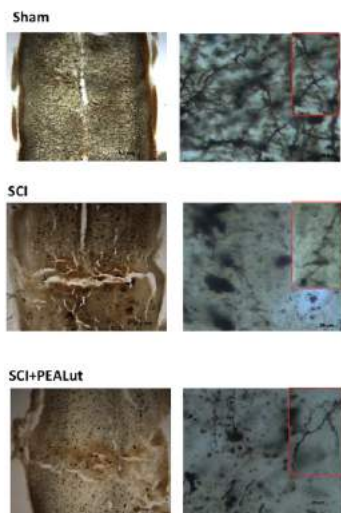


Fig. 5: Effetto del trattamento con co-ultra PEALut sull'espressione dei fattori neurotrofici





In questo set di esperimenti e' stata valutata la plasticita' sinaptica mediante la tecnica del Golgi. E' stata effettuata una valutazione di tipo qualitativo dalla quale e' emerso che il trattamento con PEALut migliora la plasticita' sinaptica rappresentata in questo caso dalla lunghezza delle ramificazioni dendritiche (Fig. 6).



**Fig. 6: analisi qualitativa delle spine dendritiche**

I risultati ottenuti sono stati oggetto della seguente pubblicazione:

*Co-Ultramicronized Palmitoylethanolamide/Luteolin Promotes Neuronal Regeneration after Spinal Cord Injury.*

*Crupi R, Impellizzeri D, Bruschetta G, Cordaro M, Paterniti I, Siracusa R, Cuzzocrea S, Esposito E. Front Pharmacol. 2016 Mar 8;7:47. doi: 10.3389/fphar.2016.00047. eCollection 2016.*

L'efficacia del biomarcatore PEOXA e' stata valutata su un modello di trauma vertebro midollare. Il primo parametro di riferimento e' rappresentato dall'analisi delle performance comportamentali svolte dall'animale dopo trattamento. In particolare e' emerso come nell'animale con trauma midollare si abbia un peggioramento di quelle che sono le attivita' motorie che di contro vengono invece significativamente migliorate dopo trattamento con PEOXA (Fig.7).

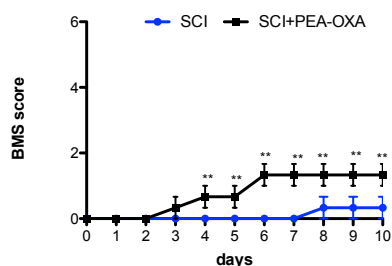


Fig. 7: effetto del trattamento con PEOXA sullo score motorio

Gli animali sono stati poi sacrificati per indagini istochimiche e molecolari.

In particolare e' stato analizzato il livello di danno istologico, dopo somministrazione con PEOXA per via intraperitoneale ed orale. Dai risultati ottenuti e' emerso che il biomarcatore PEOXA e' in grado di svolgere azione protettiva sul tessuto colpito da danno ed in particolar modo i dati istologici dimostrano una maggiore protezione dopo somministrazione per via intraperitoneale (Fig.8)

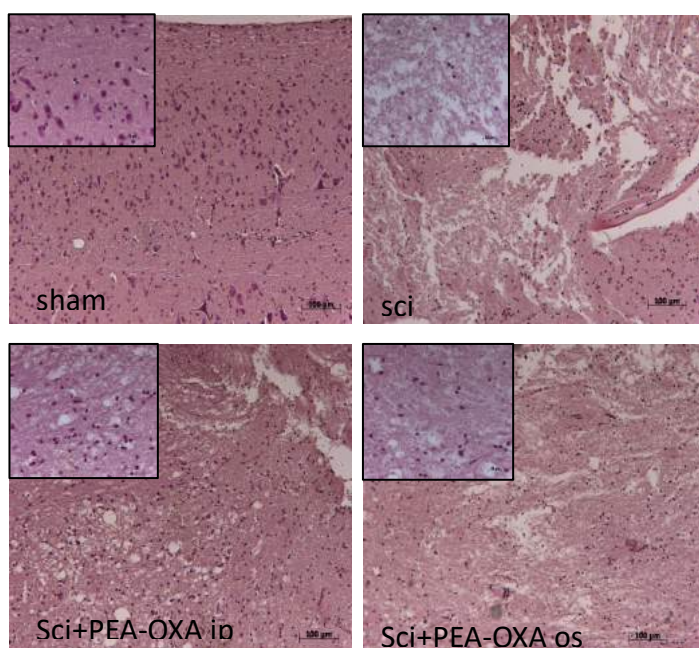


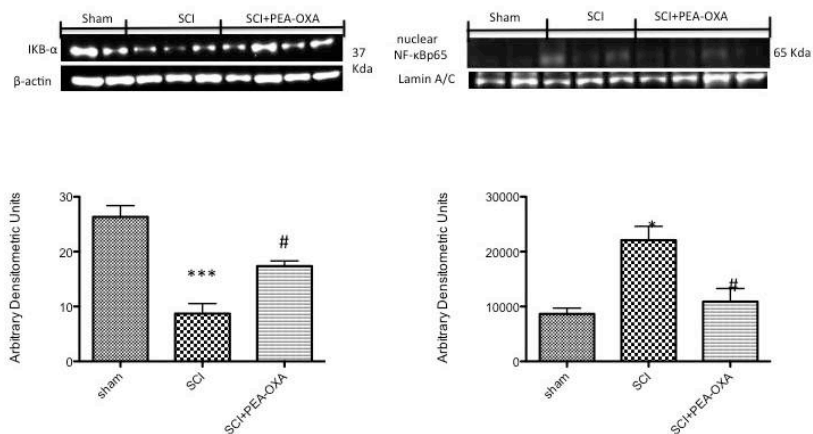
Fig. 8: Effetto del trattamento con PEOXA sul danno istologico

Per indagare il meccanismo attraverso cui il trattamento con PEOXA potrebbe attenuare i processi infiammatori indotti dal trauma, abbiamo valutato mediante analisi Western blot la degradazione di  $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$  (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha) e la trasposizione nucleare di NF- $\kappa\text{B}$  p65 (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells). Si



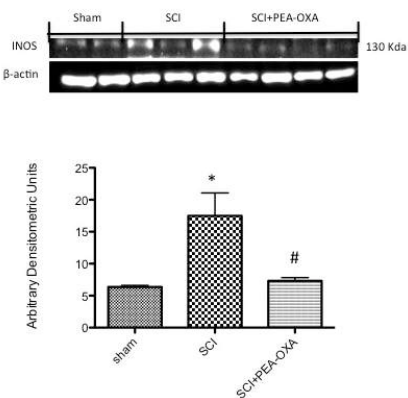


nota un'espressione basale di  $\text{I}\kappa\text{B}-\alpha$  nel gruppo controllo, mentre, nel gruppo sottoposto a trauma è stata osservata una degradazione significativa di  $\text{I}\kappa\text{B}-\alpha$ . Il trattamento con PEA OXA ha ridotto significativamente la degradazione di  $\text{I}\kappa\text{B}-\alpha$ . Al contrario, è stato osservato un aumento della traslocazione nucleare di NF $\kappa\text{B}$  p65 negli animali soggetti a trauma e la sua riduzione significativa in quelli sottoposti a trattamento con PEA OXA

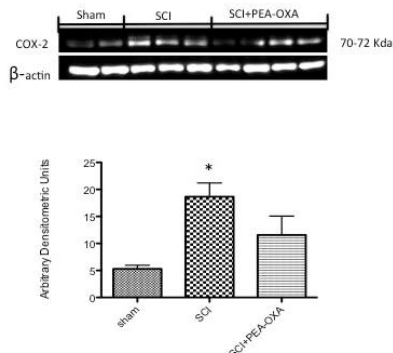


**Fig. 9: Effetto di PEA OXA sull'espressione di  $\text{I}\kappa\text{B}-\alpha$  e la traslocazione nucleare di NF $\kappa\text{B}$  p65 dopo trauma vertebro midollare**

Il processo infiammatorio che viene stimolato dopo induzione del trauma stimola l'espressione di iNOS (enzima ossido nitrico sintasi inducibile), e di COX 2 (prostaglandina-endoperossido sintasi) i cui livelli si riducono significativamente dopo trattamento con PEA OXA (Fig.10).



**Fig. 10: Effetto della PEA OXA sull'induzione di iNOS in seguito a trauma vertebro-midollare**



**Fig. 11:** Effetto della PEA OXA sull'induzione di COX2 in seguito a trauma vertebro-midollare

I risultati dello studio sono stati oggetto della seguente pubblicazione:

*N-Palmitoylethanolamine-Oxazoline as a New Therapeutic Strategy to Control Neuroinflammation: Neuroprotective Effects in Experimental Models of Spinal Cord and Brain Injury.*

*Impellizzeri DI, Cordaro MI, Bruschetta GI, Siracusa RI, Crupi RI, Esposito EI, Cuzzocrea SI,2. J Neurotrauma. 2017 Sep 15;34(18):2609-2623. doi: 10.1089/neu.2016.4808. Epub 2017 Aug 24.*

Per dare continuità a quanto sopraddetto si procederà alla valutazione di nuovi bioregolatori quali l'Adelmidrol e di flavonoidi quali la Quercetina. Per entrambi si effettueranno prove preliminari *in vivo* di tossicologia acuta, subacuta e cronica con lo scopo di evidenziare i limiti di tossicità della sostanza in esame prevedendone gli eventuali effetti dannosi o indesiderabili alle condizioni di impiego previste nell'uomo. Verrà inoltre completato lo studio degli effetti e del meccanismo d'azione di alcuni composti precedentemente utilizzati quali ad esempio la PEALut o la PEA OXA. In particolar modo si valuteranno i loro effetti sulla sfera emotivo-comportamentale legata ai processi neuroinfiammatori. A tal proposito si testerà la loro azione su sindromi psichiatriche quali il delirium e malattie a carattere neurodegenerativo quali la demenza vascolare.

Nello specifico il compound PEALut verrà somministrato ad animali da laboratorio nei quali verrà farmacologicamente indotto il delirium.

Si utilizzeranno tre diverse tipologie di trattamento con PEALut, pre-trattamento; trattamento ed azione combinata di pretrattamento e trattamento.

Gli end points da considerare riguarderanno le alterazioni a carico della sfera emotiva e comportamentale con l'utilizzo di particolari test quali:

- T Maze Test
- Open field (OF)
- Forced swim test (FST)



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA**  
**DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE, BIOLOGICHE,**  
**FARMACEUTICHE E AMBIENTALI**

Successivamente si procederà con le analisi di laboratorio per studiare l'insorgenza dei fenomeni infiammatori in diverse aree del cervello, come tali processi modificano la qualità di vita dell'animale e la fisiologia cerebrale e l'effetto prodotto dalle diverse tipologie di trattamento.

L'effetto del biomarcatore PEOXA verrà invece studiato su un modello animale di demenza vascolare. Verrà qui valutato il suo effetto sull'apprendimento e la memoria spaziale mediante impiego del test comportamentale Morris water maze; successivamente, sulle sezioni di tessuto cerebrale, mediante indagini biochimiche, molecolari ed immunostochimiche verrà valutato il meccanismo d'azione attraverso il quale il biomarcatore esplica la sua azione.



---

## STORNO TRA VOCI COAN - ESERCIZIO 2016

<b>Voce COAN</b>	<b>Denominazione voce coan</b>	<b>Previsione iniziale</b>
CA.04.40.01.02	Materiali di consumo	211.204,65
CA.04.43.18.01 -	Missioni ed iscrizioni a convegni personale docente	20.000,00
CA.04.46,07,01,01	Missioni dottorati di ricerca, borsisti e studenti	20.000,00
CA.04.46,05,05	Borse di studio su attività di ricerca	50.000,00