



**SAPIENZA**  
UNIVERSITÀ DI ROMA

**Definizione stile:** Sommario 1: Interlinea: 1,5 righe,  
Tabulazioni: 0,78 cm, Allineato a sinistra + 15,48 cm,  
Allineato a destra, Carattere di riempimento: ...

**Dottorato in Epidemiologia e Patologia Molecolare**

**Formattato:** Italiano (Italia)

**XXVI Ciclo**

**MECCANISMO DI DANNO NELLA NEUROPATIA OTTICA  
EREDITARIA DI LEBER E POSSIBILE RUOLO  
TERAPEUTICO DI SOSTANZE ESTROGENO-SIMILI**

**Relatore**

**Prof.ssa Marella Maroder**

**Dottorando**

**Dott.ssa Annalinda Pisano**

**Coordinatore del dottorato**

**Prof.ssa Raffaella Buzzetti**

# INDICE

Formattato: Tipo di carattere: 16 pt

<u>1. INTRODUZIONE .....</u>	<u>54</u>
<u>1.1 I mitocondri .....</u>	<u>64</u>
<u>1.1.1 La fosforilazione ossidativa .....</u>	<u>75</u>
<u>1.1.2 La produzione di specie reattive dell'ossigeno .....</u>	<u>97</u>
<u>1.2 Il DNA mitocondriale .....</u>	<u>108</u>
<u>1.2.1 Struttura .....</u>	<u>119</u>
<u>1.2.2 Replicazione .....</u>	<u>1240</u>
<u>1.2.3 Trascrizione e traduzione .....</u>	<u>1240</u>
<u>1.2.4 Fusione e fissione .....</u>	<u>1311</u>
<u>1.2.4 Genetica .....</u>	<u>1311</u>
<u>1.3 La Neuropatia ottica ereditaria di Leber (LHON) .....</u>	<u>1412</u>
<u>1.3.1 Epidemiologia .....</u>	<u>1644</u>
<u>1.3.2 Patofisiologia .....</u>	<u>1745</u>
<u>1.3.3 Manifestazioni cliniche .....</u>	<u>1816</u>
<u>1.3.4 Il problema della penetranza variabile e dell'alta prevalenza maschile nella LHON .....</u>	<u>1816</u>
<u>1.3.5 Prospettive terapeutiche .....</u>	<u>1917</u>
<u>1.4 I fitoestrogeni .....</u>	<u>2149</u>
<u>2. SCOPO DELLA TESI .....</u>	<u>2523</u>
<u>3. MATERIALI E METODI .....</u>	<u>2624</u>
<u>3.1 Materiali utilizzati .....</u>	<u>2624</u>
<u>3.2 Microdissezione con laser (LCM) .....</u>	<u>2826</u>
<u>3.3 Analisi del DNA mitocondriale .....</u>	<u>2826</u>

Formattato: Tipo di carattere: Times New Roman, 12 pt

<u>3.4 Allestimento di cibridi trasmitocondriali.....</u>	<u>2927</u>
<u>3.5 Condizioni di crescita .....</u>	<u>3028</u>
<u>3.6 Curve di crescita .....</u>	<u>3129</u>
<u>3.7 Apoptosi.....</u>	<u>3129</u>
<u>3.8 Analisi ultrastrutturale e istomorfometrica .....</u>	<u>3129</u>
<u>3.9 Analisi dell'espressione genica .....</u>	<u>3230</u>
<u>3.10 Analisi dell'espressione proteica.....</u>	<u>3331</u>
<u>3.11 Consumo di ossigeno.....</u>	<u>3432</u>
<u>3.12 Sintesi di ATP .....</u>	<u>3432</u>
<u>3.13 Analisi dei livelli di superossido mitocondriale.....</u>	<u>3533</u>
<u>3.14 Silenziamento di ER<math>\alpha</math> ed ER<math>\beta</math>.....</u>	<u>3533</u>
<u>3.15 Analisi statistiche.....</u>	<u>3634</u>
<u>4. RIULTATI .....</u>	<u>3735</u>
<u>4.1 Valutazione della biogenesi mitocondriale in tessuti di soggetti affetti e portatori non affetti.....</u>	<u>3735</u>
<u>4.1.1 L'analisi di tre famiglie LHON rivela un aumento del numero di copie di mtDNA dei linfociti periferici, particolarmente nei portatori non affetti. ....</u>	<u>3735</u>
<u>4.1.2 L'analisi del numero di copie di mtDNA nella retina suggerisce che le RGC della macula, target principale della LHON, hanno un alto fabbisogno energetico.....</u>	<u>3836</u>
<u>4.1.3 Il pattern di degenerazione nel nervo ottico segue il gradiente di distribuzione di mtDNA negli assoni.....</u>	<u>3937</u>
<u>4.2 Valutazione degli effetti dei fitoestrogeni sulla metabolismo cellulare nella LHON .....</u>	<u>4038</u>
<u>4.2.1 I fitoestrogeni migliorano la vitalità cellulare riducendo l'apoptosi.....</u>	<u>4138</u>
<u>4.2.2 La combinazione di fitoestrogeni induce la biogenesi mitocondriale.....</u>	<u>4240</u>
<u>4.2.3 La combinazione di fitoestrogeni migliora le competenze energetiche.....</u>	<u>4341</u>
<u>4.2.4 I fitoestrogeni riducono i livelli di superossido mitocondriale e aumentano i livelli di SOD2.....</u>	<u>4341</u>

Formattato: Tipo di carattere: Times New Roman, 12 pt
Formattato: Tipo di carattere: Times New Roman, 12 pt
Formattato: Tipo di carattere: Times New Roman, 12 pt
Formattato: Tipo di carattere: Times New Roman, 12 pt
Formattato: Tipo di carattere: Times New Roman, 12 pt
Formattato: Tipo di carattere: Times New Roman, 12 pt
Formattato: Tipo di carattere: Times New Roman, 12 pt
Formattato: Tipo di carattere: Times New Roman, 12 pt
Formattato: Tipo di carattere: Times New Roman, 12 pt
Formattato: Tipo di carattere: Times New Roman, 12 pt
Formattato: Tipo di carattere: Times New Roman, 12 pt
Formattato: Tipo di carattere: Times New Roman, 12 pt
Formattato: Tipo di carattere: Times New Roman, 12 pt
Formattato: Tipo di carattere: Times New Roman, 12 pt
Formattato: Tipo di carattere: Times New Roman, 12 pt
Formattato: Tipo di carattere: Times New Roman, 12 pt
Formattato: Tipo di carattere: Times New Roman, 12 pt
Formattato: Tipo di carattere: Times New Roman, 12 pt
Formattato: Tipo di carattere: Times New Roman, 12 pt
Formattato: Tipo di carattere: Times New Roman, 12 pt
Formattato: Giustificato
Formattato ... [1]
Formattato ... [2]
Formattato ... [3]
Formattato ... [4]
Formattato ... [5]
Formattato ... [6]
Formattato ... [7]

4.2.5 L'azione dei fitoestrogeni è mediata da ER $\beta$ .....	4442
5. DISCUSSIONE .....	6153
6. CONCLUSIONE .....	6658
7. BIBLIOGRAFIA .....	6759
<b>1. INTRODUZIONE.....</b>	<b>3</b>
1.1 I mitocondri.....	3
1.1.1 La fosforilazione ossidativa.....	4
1.1.2 La produzione di specie reattive dell'ossigeno.....	6
1.2 Il DNA mitocondriale.....	7
1.2.1 Struttura.....	8
1.2.2 Replicazione.....	9
1.2.3 Trascrizione e traduzione.....	9
1.2.4 Fusione e fissione.....	10
1.2.4 Genetica.....	10
1.3 La Neuropatia ottica ereditaria di Leber (LHON).....	11
1.3.1 Epidemiologia.....	13
1.3.2 Patofisiologia.....	14
1.3.3 Manifestazioni cliniche.....	15
1.3.4 Il problema della penetranza variabile e dell'alta prevalenza maschile nella LHON.....	15
1.3.5 Prospettive terapeutiche.....	16
1.4 I fitoestrogeni.....	18
<b>2. SCOPO DELLA TESI.....</b>	<b>22</b>
<b>3. MATERIALI E METODI.....</b>	<b>23</b>
3.1 Materiali utilizzati.....	23

Formattato	... [8]
Formattato	... [9]
Formattato	... [10]
Formattato	... [11]
Formattato	... [12]
Formattato	... [13]
Formattato	... [14]
Formattato	... [15]
Formattato	... [16]
Formattato	... [17]
Formattato	... [18]
Formattato	... [19]
Formattato	... [20]
Formattato	... [21]
Formattato	... [22]
Formattato	... [23]
Formattato	... [24]
Formattato	... [25]
Formattato	... [26]
Formattato	... [27]

<a href="#">3.2 Microdissezione con laser (LCM)</a> .....	25	Formattato	... [28]
<a href="#">3.3 Analisi del DNA mitocondriale</a> .....	25	Formattato	... [29]
<a href="#">3.4 Allestimento di cibridi trasmitocondriali</a> .....	26	Formattato	... [30]
<a href="#">3.5 Condizioni di crescita</a> .....	27	Formattato	... [31]
<a href="#">3.6 Curve di crescita</a> .....	28	Formattato	... [32]
<a href="#">3.7 Apoptosi</a> .....	28	Formattato	... [33]
<a href="#">3.8 Analisi ultrastrutturale e istomorfometrica</a> .....	28	Formattato	... [34]
<a href="#">3.9 Analisi dell'espressione genica</a> .....	29	Formattato	... [35]
<a href="#">3.10 Analisi dell'espressione proteica</a> .....	30	Formattato	... [36]
<a href="#">3.11 Consumo di ossigeno</a> .....	31	Formattato	... [37]
<a href="#">3.12 Sintesi di ATP</a> .....	31	Formattato	... [38]
<a href="#">3.13 Analisi dei livelli dei ROS</a> .....	32	Formattato	... [39]
<a href="#">3.14 Silenziamento di ER<math>\alpha</math> ed ER<math>\beta</math></a> .....	32	Formattato	... [40]
<a href="#">3.15 Analisi statistiche</a> .....	33	Formattato	... [41]
<a href="#">4. RISULTATI</a> .....	34	Formattato	... [42]
<a href="#">4.1 Studio della valutazione dell'mtDNA</a> .....	34	Formattato	... [43]
<a href="#">4.1.1 Valutazione del numero di copie dell'mtDNA e della biogenesi mitocondriale in campioni ematici</a> .....	34	Formattato	... [44]
<a href="#">4.1.2 Valutazione del numero di copie dell'mtDNA in campioni di retina</a> .....	35	Formattato	... [45]
<a href="#">4.1.3 Valutazione del numero di copie dell'mtDNA in campioni di nervo ottico</a> .....	36	Formattato	... [46]
<a href="#">4.2 Studio degli effetti dei fitoestrogeni sulla metabolismo cellulare</a> .....	37	Formattato	... [47]
<a href="#">4.2.1 I fitoestrogeni migliorano la vitalità cellulare riducendo l'apoptosi</a> .....	37	Formattato	... [48]
<a href="#">4.2.2 La combinazione di fitoestrogeni induce la biogenesi mitocondriale</a> .....	39	Formattato	... [49]
<a href="#">4.2.3 La combinazione di fitoestrogeni migliora le competenze energetiche</a> .....	40	Formattato	... [50]
<a href="#">4.2.4 I fitoestrogeni riducono i livelli dei ROS e aumentano i livelli di SOD2</a> .....	40	Formattato	... [51]
<a href="#">4.2.5 L'azione dei fitoestrogeni è mediata da ER<math>\beta</math></a> .....	41	Formattato	... [52]

5. DISCUSSIONE .....52

6. BIBLIOGRAFIA .....58

- Formattato: Tipo di carattere: 12 pt
- Formattato: Tipo di carattere: Times New Roman, 12 pt
- Formattato: Tipo di carattere: 12 pt
- Formattato: Tipo di carattere: Times New Roman, 12 pt
- Formattato: Tipo di carattere: 12 pt
- Formattato: Tipo di carattere: Times New Roman, 12 pt
- Formattato: Tipo di carattere: 12 pt
- Formattato: Tipo di carattere: Times New Roman, 12 pt

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 I mitocondri

I mitocondri sono organelli citoplasmatici a doppia membrana, altamente specializzati, presenti in quasi tutte le cellule degli eucarioti. Si pensa che i mitocondri derivino da procarioti primordiali capaci di effettuare la respirazione, incorporati stabilmente in cellule eucariotiche ospiti incapaci di respirazione, e mantenuti durante l'evoluzione. La loro lunghezza varia da  $1\text{ }\mu\text{m}$  a  $5\text{ }\mu\text{m}$  con un diametro medio di circa  $0,5\text{ }\mu\text{m}$ . Il loro numero è molto variabile, da un solo mitocondrio in alcune alghe unicellulari alle decine di migliaia degli ovociti, ma nella maggior parte delle cellule ne sono presenti in media 500-1000. I mitocondri mantengono una struttura costante costituita da due membrane fosfolipidiche che delimitano due compartimenti distinti: lo spazio intermembrana e la matrice mitocondriale (Figura 1).

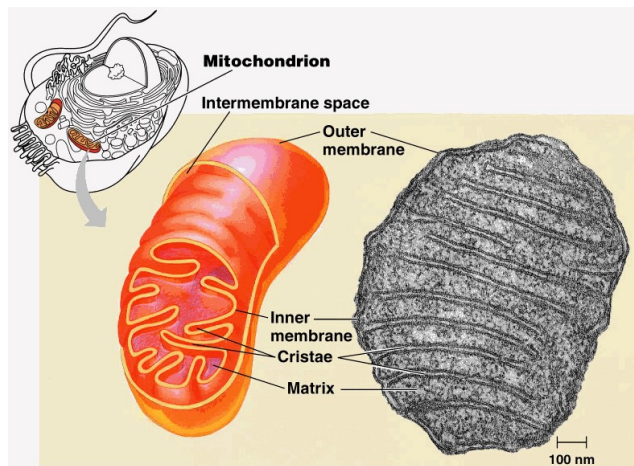


Figura 1. Organizzazione strutturale dei mitocondri.

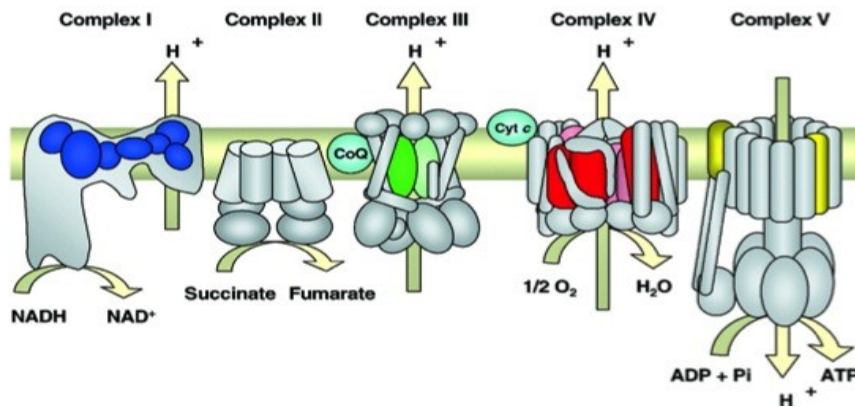
La membrana esterna è caratterizzata da canali proteici transmembrana (porine) che la rendono permeabile a ioni e molecole con peso molecolare inferiore a 5000 Dalton. La membrana interna, invece, è impermeabile alla maggior parte degli ioni di piccole dimensioni e si invagina a formare strutture tubulari denominate creste, che hanno lo scopo di aumentare la superficie, e contiene i complessi della catena respiratoria, l'ATP – ADP traslocasi e altri trasportatori di membrana. Nella matrice mitocondriale, invece, sono presenti gli enzimi dell'ossidazione degli acidi grassi e del piruvato, quelli del ciclo di Krebs, la glutammico deidrogenasi ed altri del metabolismo aminoacidico.

I mitocondri sono componenti chiave del signalling del calcio, della regolazione del metabolismo cellulare, della sintesi degli steroidi, della morte cellulare programmata (apoptosi) e soprattutto della produzione dei radicali liberi. Sicuramente, però, il ruolo principale è nel metabolismo energetico. Questo include il ciclo di Krebs, la  $\beta$ -ossidazione degli acidi grassi e soprattutto la fosforilazione ossidativa che ha luogo a livello della catena della respirazione mitocondriale.

### ***1.1.1 La fosforilazione ossidativa***

Il sistema della fosforilazione ossidativa (OXPHOS) comprende cinque complessi multiproteici (complessi da I a V) e due trasportatori mobili di elettroni (Ubichinone e Citocromo c) incorporati nel doppio strato lipidico della membrana mitocondriale interna (Figura 2). I primi quattro complessi redox (complesso I-IV) costituiscono la catena respiratoria che trasferisce elettroni da NADH (nicotinammide adenin dinucleotide) e FADH<sub>2</sub> (flavin adenin dinucleotide) a molecole di ossigeno, l'accettore finale degli elettroni.





**Figura 2. Catena di trasporto degli elettroni.**

La figura illustra i complessi proteici coinvolti nella fosforilazione ossidativa (Zeviani M et al, 2004).

Il complesso I (NADH deidrogenasi) rappresenta il primo tra i complessi respiratori dove gli elettroni donati dall'ossidazione del NADH vengono direzionati, attraverso 6-9 gruppi redox, al primo trasportatore mobile, l'Ubichinone. Il Complesso II (Succinato deidrogenasi) è il più semplice di tutti i complessi respiratori. È il solo ad essere legato alla membrana mitocondriale interna e trasferisce gli elettroni dal succinato all'ubichinone. A differenza degli altri complessi tutte le subunità sono codificate dal DNA nucleare. Il Coenzima Q (Ubichinone) si trova inserito nel doppio strato lipidico della membrana interna dove diffonde liberamente tra i complessi respiratori. Riceve gli elettroni dai due complessi deidrogenasi e li trasferisce al complesso III. Il Complesso III (Ubichinol-citocromo c ossidoreduttasi) trasferisce gli elettroni dall'Ubichinolo al Citocromo c. Il Citocromo c è una piccola proteina solubile ancorata al lato esterno della membrana interna mitocondriale. Rappresenta il secondo trasportatore mobile di elettroni. Il complesso IV (Citocromo c ossidasi, COX) è l'enzima terminale della catena respiratoria.

Catalizza il trasferimento di elettroni dal Citocromo c all'ossigeno molecolare che viene ridotto a due molecole di acqua. Il complesso V (ATP sintasi) sintetizza ATP usando la forza motrice protonica attraverso la membrana.

Il trasporto degli elettroni nella catena respiratoria è accoppiato al trasporto di protoni dalla matrice mitocondriale allo spazio intermembrana mitocondriale, generando un potenziale elettrochimico di protoni che è utilizzato dall'ATP sintasi per formare ATP. Inoltre il trasporto di elettroni attraverso i componenti della catena respiratoria genera radicali dell'ossigeno (ROS, Reactive oxygen species), in particolare a livello del Ce complesso I e III.

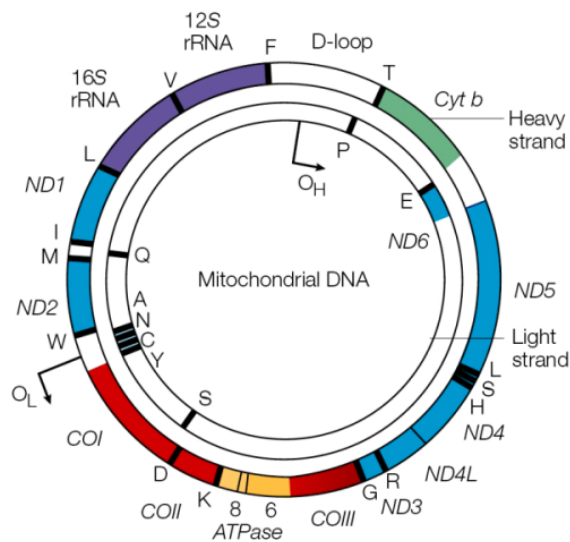
#### ***1.1.2 La produzione di specie reattive dell'ossigeno***

I mitocondri costituiscono la fonte cellulare principale di anione superossido e di altre specie reattive dell'ossigeno (Green DR and Reed JC, 1998). L'origine mitocondriale dei ROS è stata identificata nel Ce complesso I e nel Ce complesso III della catena respiratoria: durante il normale trasferimento di elettroni dal donatore NADH all'ossigeno molecolare, una porzione tra 1% e 5% di questi elettroni viene persa formando anione superossido (Lenaz G., 1998). Normalmente la produzione di anione superossido viene controllata, almeno in parte, dall'azione di due enzimi: 1) la superossido dismutasi (SOD), presente nel citosol, nei mitocondri e nello spazio extracellulare, che converte l'anione superossido in perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ); 2) nei perossisomi  $H_2O_2$  può essere convertito in ossigeno molecolare e acqua, oppure ridotto dall'enzima glutatione perossidasi, localizzato nei mitocondri e nel citosol (Wallace DC and Melov S, 1998). Se il trasporto elettronico è danneggiato o inibito, la produzione di anione superossido può raggiungere livelli difficilmente controllabili dagli enzimi di protezione cellulare. In questi casi lo stress ossidativo derivante dalla presenza di ROS può danneggiare sia il DNA mitocondriale

(mtDNA) che quello nucleare (nDNA). Il mtDNA, però, è maggiormente suscettibile al danno in quanto provvisto di sistemi di riparazione poco efficaci.

## 1.2 Il DNA mitocondriale

L' mtDNA umano è una piccola molecola circolare a doppia elica, di 16569 paia di basi (bp). I due filamenti hanno una composizione in basi differente: il filamento pesante (H-strand) e più ricco in guanine, mentre il filamento leggero (L-strand) e più ricco in citosine (Figura 3).



**Figura 3. Mappa del genoma mitocondriale umano.**

Diagramma schematico della molecola a doppia elica ~~dell' mtDNA~~ di mtDNA. Il cerchio esterno rappresenta il filamento pesante (Heavy strand), quello interno il filamento leggero (Light strand). In blu sono mostrati i geni che codificano per le subunità del complesso I; in verde il citocromo b del Complesso III; in rosso i geni che codificano per le subunità del Complesso IV; in giallo le subunità dell' ATP sintasi. I due rRNA sono rappresentati in viola mentre i 22 tRNA da linee nere.

(Taylor RW and Turnbull DM, 2005).

Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Italiano (Italia)

Un mitocondrio contiene decine di copie del suo genoma mitocondriale e ogni cellula contiene numerosi mitocondri. Pertanto, una data cellula può contenere diverse migliaia di copie del suo genoma mitocondriale, ma solo una copia del suo genoma nucleare. Il numero di copie varia da 100 a 10000 nei differenti tipi cellulari in base alla richiesta energetica (Taylor RW and Turnbull DM, 2005).

Formattato: Italiano (Italia)

### **1.2.1 Struttura**

Il DNA mitocondriale codifica per 22 RNA transfer (tRNA) e due RNA ribosomiali (rRNA), necessari alla sintesi proteica mitocondriale, e per 13 subunità proteiche della catena respiratoria: sei subunità del Complesso I (ND1-ND6, ND4L), una subunità del Complesso III (Cyt b), tre subunità del Complesso IV (COI-COIII) e due subunità del Complesso V (ATPase6 e 8) (Figura 3). Le restanti subunità della catena respiratoria, così come gli enzimi deputati alle diverse vie metaboliche mitocondriali, la DNA polimerasi, la RNA polimerasi e numerosi altri enzimi regolatori, vengono codificati da geni nucleari, sintetizzati nel citoplasma e, secondariamente, importati nei mitocondri (Mokranjac D and Neupert W, 2005).

A differenza del DNA nucleare, l'mtDNA è straordinariamente compatto: il 93% circa della sequenza è codificante. I suoi geni mancano di regioni introniche e la maggior parte di essi sono contigui, separati solo da una o due coppie di basi non codificanti. Ne risulta quindi un'organizzazione molto compatta, resa ancora più compatta dal fatto che alcuni geni sono parzialmente sovrapposti. Presenta solo una significativa regione non codificante, il D-loop (displacement loop), che contiene il sito di inizio per la replicazione del filamento pesante (OH) e i promotori per la trascrizione di entrambi i filamenti dell'mtDNA. A causa della scarsa disponibilità di meccanismi di riparazione e dell'assenza di proteine istoniche il DNA mitocondriale è altamente variabile,

specialmente nella regione del D-loop con un tasso di mutazione 7-10 volte più elevato che nel DNA nucleare.

### ***1.2.2 Replicazione***

Negli eucarioti, l' mtDNA è replicato in un "replisoma" (un complesso DNA/proteina che costituisce il macchinario di replicazione) da un complesso proteico composto da una subunità catalitica, la polimerasi gamma, e da due subunità accessorie (Copeland WC, 2012). La replicazione avviene a partire da due diverse origini, che si trovano rispettivamente sul filamento pesante (OH) e sul filamento leggero (OL) ed inizia nel D-loop con la catena pesante. Essa viene replicata dalla polimerasi gamma a partire dall'origine OH e la catena figlia si forma in senso orario separando le due catene H e L. Arriva fino all'origine della replicazione della catena L e procede in senso antiorario. Quando le catene figlie sono complete, esse si separano e formano una nuova molecola. La replicazione del mtDNA è quindi un processo bidirezionale ed asincrono (Clayton DA, 1982).

### ***1.2.3 Trascrizione e traduzione***

Le unità trascrizionali mitocondriali sono complessi siti all'interno della regione regolatoria del D-loop. La trascrizione ~~dell' mtDNA~~ di mtDNA coinvolge un complesso proteico contenente una RNA polimerasi mitocondriale (*POLRMT*) formata nel citoplasma e poi successivamente importata nei mitocondri, il fattore di trascrizione mitocondriale A (*TFAM*) e una delle due isoforme di TFB (*TFB1M* and *TFB2M*) che sembra collegare TFAM con l'RNA polimerasi facilitando l'inizio della trascrizione (McCulloch V et al, 2002). TFAM, oltre a fungere da attivatore trascrizionale, svolge anche un ruolo di stabilizzazione ~~di~~ del mtDNA (Scarpulla RC, 2008).

La traduzione degli mRNA dei geni mitocondriali è eseguita all'interno del mitocondrio stesso. L'apparato di traduzione mitocondriale umano comprende ribosomi specifici, 22 tRNA diversi, un gruppo di aminoacil-tRNA sintetasi specifiche e fattori di iniziazione e di allungamento. I mitocondri, inoltre, utilizzano un codice genetico leggermente differente da quello standard. Innanzitutto, i codoni di stop non comprendono la tripletta UGA (che nel codice genetico mitocondriale codifica per il triptofano) e sono quattro invece di tre, oltre a UAA e UAG funzionano come codoni di stop anche le triplette AGA e AGG (che nel codice genetico nucleare codificano per l'arginina).

#### ***1.2.4 Fusione e fissione***

La fusione mitocondriale ha la funzione di mantenere i mitocondri interconnessi in modo da ottimizzarne varie funzioni, come il trasferimento del potenziale di membrana mitocondriale da regioni della cellula ricche in ossigeno a regioni anossiche. Per fissione mitocondriale, invece, si intende la rottura della rete mitocondriale in piccoli organelli isolati. Si manifesta nelle cellule in divisione per assicurare l'ereditarietà del patrimonio mitocondriale. L'eccessiva fissione mitocondriale, dovuta ad assenza di eventi di fusione, provoca rottura della rete mitocondriale, perdita del DNA mitocondriale, perdita della funzionalità respiratoria ed aumento nella produzione dei ROS (Yaffe MP, 1999).

#### ***1.2.4 Genetica***

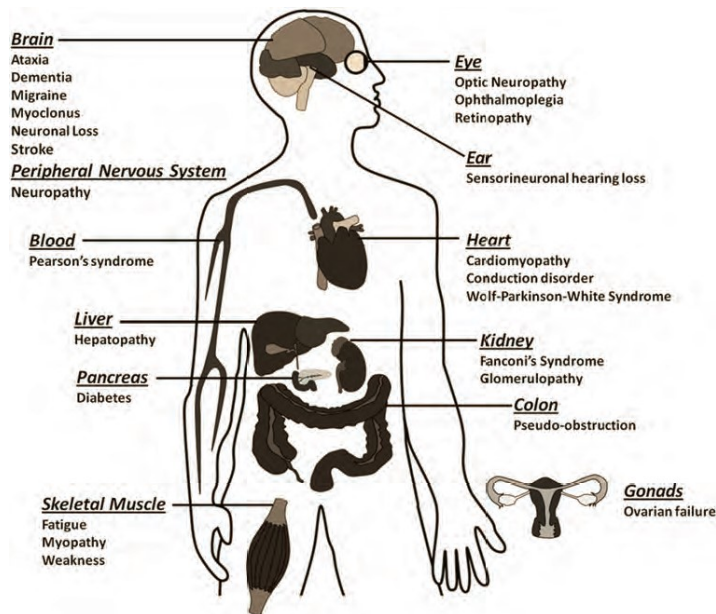
In condizioni normali tutte le copie di mtDNA sono identiche, una condizione nota come omoplasma. Tuttavia, la tendenza intrinseca del mtDNA a mutare casualmente può determinare, una condizione transitoria nota come eteroplasma, nella quale coesistono nella stessa cellula molecole di mtDNA normali "wild-type" e mutati.

Dal momento che ci sono più mitocondri all'interno di ogni cellula, e che ci possono essere centinaia di copie di mtDNA all'interno di una particolare cellula, la percentuale di mtDNA mutante può variare tra 0 e 100. Maggiore è il carico di mutazioni dell' mtDNA all'interno dei tessuti o delle cellule, maggiore è il livello di disfunzione mitocondriale. Per l'espressione della malattia sono richiesti un numero minimo di genomi mitocondriali mutati, condizione nota come "effetto soglia". L'effetto soglia è un concetto relativo dal momento che la percentuale di mutazione necessaria all'insorgenza della disfunzione mitocondriale dipende dalla richiesta metabolica del tessuto: è tanto più bassa quanto più è elevato il fabbisogno energetico del tessuto o dell'organo (Davids RL and Sue CM, 2011). Inoltre il genoma mitocondriale viene ereditato per via materna; la madre trasmette il suo mtDNA dell'oocita a tutti i suoi discendenti con nessun contributo ~~dell'mtDNA~~ di mtDNA paterno (Giles RE et al, 1980).

### **1.3 La Neuropatia ottica ereditaria di Leber (LHON)**

Negli ultimi tre decenni gli studi di genetica molecolare hanno portato a importanti progressi nella comprensione delle malattie mitocondriale e nella capacità di classificarli. Le malattie mitocondriali sono causate da una perdita della funzione mitocondriale, spesso a causa di mutazioni genetiche nel mtDNA o nel nDNA e colpiscono sia adulti che bambini. In genere sono caratterizzate da mutazioni eteroplasmiche del mtDNA o da mutazioni in geni nucleari codificanti proteine coinvolte in maniera più o meno diretta nella fosforilazione ossidativa, responsabili di danno del metabolismo cellulare aerobico. Dal momento che possono colpire qualunque organo, lo spettro delle malattie mitocondriali è vario (Figura 4). Tuttavia i tessuti caratterizzati da una forte domanda

metabolica, come quello nervoso, muscolare e cardiaco, sono tipicamente colpiti. Per questo le malattie mitocondriali sono spesso definite come encefalomiopatie mitocondriali.



**Figura 4. Spettro clinico delle malattie mitocondriali.**

Nella figura sono rappresentati gli organi affetti da disfunzione mitocondriale e le malattie corrispondenti (Chinnery PF et al, 2013).

Il nervo ottico è fortemente dipendente dai mitocondri: un'ampia categoria di neuropatie ottiche, sia di origine genetica che ambientale, sono determinate, infatti, da disfunzioni mitocondriali (Sadun AA, 2002). Le neuropatie ottiche mitocondriali (MON) sono disturbi associati alla disfunzione e perdita delle cellule ganglionari retiniche (RGC), con conseguenza perdita della visione centrale. Rappresentano, per questo, un'importante causa di disfunzione cronica visiva (Yu-Wai-Man P et al, 2011). Le due forme più comuni di

Formattato: Italiano (Italia)



MON sono l'Atrofia Ottica Dominante (DOA) e la Neuropatia ottica ereditaria di Leber (LHON).

La LHON è una malattia a trasmissione materna che colpisce prevalentemente giovani maschi. È stata definita come entità clinica nel 1871 dall'oculista tedesco Theodore Leber e nel 1988 è stata riportata come la prima malattia mitocondriale ereditaria (Wallace DC et al, 1988). È dovuta principalmente (95% dei soggetti LHON studiati) a tre mutazioni puntiformi ~~dell'mtDNA~~ di mtDNA (11778/ND4, 3460/ND1, 14484/ND6) sui geni che codificano per le subunità del Complesso I della catena respiratoria mitocondriale (Carelli et al, 2004). La LHON è caratterizzata dalla degenerazione selettiva delle RGC che porta ad atrofia ottica e perdita della visione centrale. La penetranza della malattia (percentuale degli affetti sul numero totale dei portatori della malattia) è molto alta nei maschi rispetto alle donne. Uno studio ben documentato su una famiglia brasiliana, dimostra come la perdita della vista colpisce il 45% dei maschi e solo il 10% delle donne (Sadun AA et al, 2003). La penetranza inoltre può variare tra le famiglie e all'interno dello stesso pedigree. Fattori che possono influenzare la malattia includono l'eteroplasmia, fattori ambientali (come l'uso di alcool e tabacco), background ~~dell'mtDNA~~ di mtDNA e modificazioni nei geni nucleari. Nonostante in molte famiglie le mutazioni mitocondriali patogene siano presenti in condizioni omoplasmiche, non tutti gli individui della linea materna sviluppano la malattia. Per questo motivo l'esistenza di ulteriori determinanti genetiche, come le modificazioni di geni nucleari, è stata fortemente ipotizzata e discussa (Carelli V et al, 2004; Hudson G et al, 2007; Shankar SP et al, 2008).

### ***1.3.1 Epidemiologia***

La LHON è la malattia mitocondriale più comune, con una frequenza stimata di 15 su 100.000. Gli studi più dettagliati provengono da dati sulle popolazione del nord Europa ed

Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Italiano (Italia)

evidenziano una frequenza di 1 su 30.000 nel nord-est dell'Inghilterra, 1 su 40.000 in Olanda e 1 su 50.000 in Finlandia (Fraser JA et al, 2010; Man PY et al, 2003). Tuttavia, molte volte la malattia è sottovalutata; spesso infatti la diagnosi di atrofia ottica è inadeguata o non diagnosticata e spesso il disturbo si manifesta in età avanzata (Sadun AA et al, 2011).

Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Italiano (Italia)

### ***1.3.2 Patofisiologia***

La causa eziologica primaria è la mutazione nell'mtDNA, condizione necessaria, ma non sufficiente, per portare alla perdita della vista. Infatti molti individui portatori delle mutazioni rimangono asintomatici, sebbene caratterizzati da alcuni aspetti clinici minori. Tutte e tre le mutazioni puntiformi caratteristiche della LHON coinvolgono il primo sito della catena di trasporto degli elettroni e portano ad una riduzione della sintesi di ATP, aumentando lo stress ossidativo e predisponendo le cellule ad un processo apoptotico (Carelli V et al, 2004). La gravità del fenotipo biochimico è maggiore per le mutazioni 3460/ND1 e 11778/ND4, e minore per 14484/ND6. Le cellule ganglionari retiniche, colpite selettivamente nella LHON, hanno un grande soma che si trova nella retina interna e danno origine ad assoni amielinici che costituiscono lo strato delle fibre nervose retiniche (RNFL). Ogni assone diventa mielinico dopo aver attraversato la lamina cribrosa e andando a formare il nervo ottico. Analisi istopatologiche, mostrano la perdita delle RGC, in particolare quelle che contribuiscono al fascio papillomaculare, e atrofia del nervo ottico con una notevole demielinizzazione. L'esatto meccanismo che porta alla morte delle RGC resta ancora da chiarire ed è soggetto di diversi studi.

### ***1.3.3 Manifestazioni cliniche***

La LHON è caratterizzata da una rapida perdita della visione centrale in un occhio. La manifestazione è generalmente indolore ed è associata ad anomalie nella percezione dei colori. Spesso il secondo occhio può essere colpito dopo pochi giorni o mesi, raramente dopo anni. Solitamente la perdita della vista è permanente, anche se può avvenire un lieve recupero spontaneo nella vista. La perdita della vista è generalmente l'unica manifestazione clinica, anche se sono stati riportati casi di pazienti con disfunzione cardiaca, scheletrica o neurologica (Carelli V et al, 2004).

### ***1.3.4 Il problema della penetranza variabile e dell'alta prevalenza maschile nella LHON***

La penetranza della LHON è molto alta nei maschi rispetto alle donne portatrici delle mutazioni patogene. Una possibile spiegazione di questo fenomeno è legata all'~~effette~~effetto protettivo degli estrogeni sul metabolismo delle cellule affette. Infatti, è stato recentemente dimostrato, che concentrazioni farmacologiche di 17-βestradiolo inducono l'attivazione della biogenesi mitocondriale in cellule ottenute da pazienti affetti da LHON. Questo fenomeno si associa ad un aumento della vitalità e ad un miglioramento delle capacità bioenergetiche delle cellule mutate. Gli effetti descritti sono inibiti da antagonisti recettoriali specifici (ICI 182,780 o fulvestrant). Lo stesso studio dimostra che le cellule ganglionari della retina esprimono i recettori estrogenici β (ERβ). Nel complesso, questi dati suggeriscono come la bassa prevalenza della LHON nel sesso femminile potrebbe essere secondaria ad un ~~ad un~~ effetto protettivo degli estrogeni (Giordano C et al, 2011). Tale risultato apre anche nuove prospettive terapeutiche. Infatti, sostanze naturali ad azione estrogeno-simile come i fitoestrogeni, potrebbero essere utilizzate a scopo terapeutico in

pazienti che non hanno ancora sviluppato la malattia, allo scopo di ritardarne l'esordio ed eventualmente, in associazione ad altri farmaci, di ridurne la gravità.

A riprova del ruolo della biogenesi mitocondriale nel modulare la penetranza nella LHON ~~due~~ recenti studi effettuati su un esiguo numero di pazienti, hanno dimostrato come il numero di copie di mtDNA in linfociti isolati da sangue periferico di pazienti affetti da LHON e da portatori sani della mutazione, sia aumentato rispetto ad una popolazione di controllo. Di particolare interesse è l'evidenza che nei portatori sani il numero di copie di mtDNA per cellula sembra essere significativamente più elevato rispetto ai soggetti affetti (Yen MY et al, 2002; Nishioka T et al, 2004; Iommarini L et al, 2012).

L'insieme dei dati riportati permette di formulare l'ipotesi secondo la quale, l'attivazione della biogenesi mitocondriale, con conseguente aumento del numero di mitocondri e/o di copie di mtDNA, potrebbe giocare un ruolo determinante nel modulare la penetranza delle mutazioni mitocondriali associate a neuropatia ottica di Leber. In particolare, i soggetti affetti potrebbero essere portatori di mutazioni e/o polimorfismi a carico di uno o più geni nucleari coinvolti in questo processo, tali da renderlo deficitario, così come le donne potrebbero essere in parte protette dall'azione estrogenica. E' chiaro come una migliore comprensione dei meccanismi funzionali che regolano la biogenesi mitocondriale potrebbe essere di fondamentale importanza per identificare possibili geni modificatori e per approntare nuove strategie terapeutiche nella LHON.

### ***1.3.5 Prospettive terapeutiche***

Ad oggi non è stata identificata nessuna terapia efficace per le malattie mitocondriali. Diversi sono stati gli approcci e gli studi rivolti all'identificazione di terapie appropriate per la LHON, come per le altre disfunzioni mitocondriali.

Agenti antiossidanti: dal momento che le malattie mitocondriali, e in particolare la LHON, sono associate ad induzione dello stress ossidativo, negli ultimi anni sono stati esplorati i possibili effetti, a fini terapeutici, di alcuni antiossidanti. Diversi studi hanno suggerito che l'ibedenone, analogo del coenzima Q10, può avere lievi effetti benefici (Klopstock T et al, 2011; Carelli V et al 2011). Effetti positivi sono stati osservati anche in seguito al trattamento con il chinone EPI-743, una piccola molecola, la cui azione può essere coinvolta nel controllo metabolico, nell'azione antiossidante e nella morte cellulare, che sembrerebbe arrestare la malattia (Sadun AA et al. 2012). Altri antiossidanti, quali l'acido folico, l'acido ascorbico e il coenzima Q10 sono stati valutati clinicamente senza benefici dimostrabili (Huang CC et al, 2002). Ad oggi si è verificato che queste molecole sono in grado di attenuare le conseguenze biochimiche delle disfunzioni mitocondriali ma non di curare i difetti primari.

Terapia genetica: la terapia genica offre una promessa nel trattamento delle malattie mitocondriali ma allo stesso tempo rimane una sfida aperta. Una strategia utilizzata è quella di esprimere la proteina codificata dall'mtDNA nel nucleo, dopo aver corretto il nucleotide mutato (espressione allotropica nucleare di un gene mitocondriale). La proteina così modificata viene trasportata attraverso un vettore AAV (virus adenoassociato) nelle cellule bersaglio (in questo caso le RGC), viene espressa nel citoplasma, poi importata nei mitocondri e assemblata all'interno di specifici complessi enzimatici nella membrana mitocondriale interna. A questo punto va a competere con la versione mutata espressa localmente dall'mtDNA. Tuttavia diversi sono stati i dubbi espressi nei confronti di questo approccio (Perales-Clemente E et al, 2011).

Attivazione della biogenesi mitocondriale: Recenti studi hanno sottolineato una relazione tra i difetti respiratori, la produzione dei ROS e l'attivazione compensatoria della biogenesi

Formattato: Italiano (Italia)

mitocondriale, una strategia adottata dalle cellule nei disordini mitocondriali (Moreno-Loshuertos R et al, 2006). Questi studi hanno aumentato l'interesse per l'attivazione della biogenesi mitocondriale come possibile strategia terapeutica. E' stata investigata l'azione di varie molecole, tra cui il bezafibrato che porta all'attivazione farmacologica della biogenesi mitocondriale promettendo di essere un approccio terapeutico efficace per i disturbi mitocondriali (Wenz T et al, 2008). Inoltre, come detto precedentemente, il 17 $\beta$ -estradiolo migliora i difetti biochimici nella LHON, attraverso l'attivazione della biogenesi mitocondriale (Giordano C et al, 2011), suggerendo un potenziale ruolo terapeutico di molecole naturali estrogeno-simili.

Formattato: Italiano (Italia)

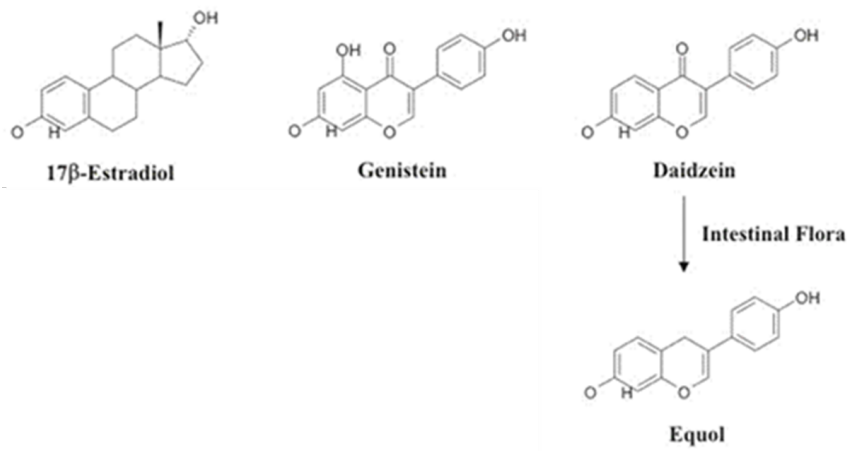
Formattato: Italiano (Italia)

#### 1.4 I fitoestrogeni

Gli estrogeni giocano un ruolo chiave nella maturazione sessuale e nella fertilità, nel metabolismo glucidico e lipidico, nello sviluppo scheletrico, nell'omeostasi del sistema cardiovascolare e del sistema nervoso centrale. Il meccanismo d'azione degli estrogeni si esplica o attraverso l'attivazione di geni bersaglio (via "genomica") o per modulazione rapida di secondi messaggeri intracellulari (via extra-genomica). Nella via "genomica", il legame degli estrogeni al proprio recettore ER (estrogen receptor), determina il rilascio di heat shock proteins (HSP), che mantengono il recettore allo stato inattivo, e la dimerizzazione del recettore. Il complesso ER-ligando migra nel nucleo dove lega particolari attivatori o repressori e interagisce con specifiche sequenze di DNA, gli elementi responsivi agli estrogeni (ERE), modulando la trascrizione dei geni bersaglio (Nilsson S et al, 2011). Gli effetti rapidi "non-genomici" si verificano in pochi secondi o minuti dall'esposizione all'estrogeno (Levin ER et al, 2008). Questi effetti riguardano i

recettori per gli estrogeni associati alle membrane plasmatiche e determinano l'attivazione a valle di specifiche chinasi e delle loro molecole effettrici. Sono stati individuati due diversi recettori nucleari per gli estrogeni, l'isoforma  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) e quella  $\beta$  (ER $\beta$ ), identificati in tutti i tipi di cellule anche se espressi in modo differente nei vari tessuti e tipi cellulari (Gustafsson JA, 1999). In aggiunta alla loro presenza nei nuclei e nelle membrane plasmatiche, ER $\alpha$  and ER $\beta$ , sono localizzati anche nei mitocondri di diversi tessuti (Yang SH et al, 2004).

Gli ER possono essere attivati non solo dagli estrogeni ma anche da molecole naturali con proprietà estrogeno-simili: i fitoestrogeni. Negli ultimi anni è notevolmente cresciuto l'interesse per queste sostanze di origine vegetale implicate in diverse attività biologiche che mimano strutturalmente e funzionalmente gli estrogeni (Dixon RA, 2004) (Figura 5).



**FIGURA 5** Struttura molecolare degli isoflavoni ricorda quella del 17- $\beta$ -estradiolo.  
(Zhao L et al, 2009)

Infatti sono in grado di legarsi ai recettori degli estrogeni (agendo sia da agonisti che da antagonisti) e di stimolarli, producendo effetti diversi, vista la diversa distribuzione

tissutale di ER $\alpha$  ed ER $\beta$ . L'affinità dei fitoestrogeni per gli ER è mille volte inferiore a quella degli ormoni estrogeni, per questo, la loro azione, è sempre più blanda.

I fitoestrogeni sono presenti come precursori in tutto il mondo vegetale, in particolare nella soia e in molti tipi di frutta, verdure e cereali integrali, e per essere biologicamente attivi dopo la loro ingestione devono essere attivati dalla flora batterica intestinale.

Possono essere classificati in tre gruppi: lignani, cumestani e isoflavoni.

I lignani sono contenuti nei tessuti legnosi delle piante, nei cereali (soprattutto nella segale), ed in alcuni vegetali (frutti di bosco, prugne, ciliegie, pere, asparagi, patate dolci, carote). Sono rappresentati dal matairesinolo e dal secoisolariciresinolo.

I cumestrani rappresentati dal cumestrololo, sono presenti soprattutto nei germogli di fagioli e nel trifoglio.

Gli isoflavoni rappresentano la classe di fitoestrogeni più studiata e sono presenti principalmente nei semi di soia. Possiedono una struttura non-steroidale ma con un anello fenolico, mediante il quale avviene il legame con il recettore degli estrogeni (Makela S et al, 1994). I due principali isoflavoni, genisteina e daidzeina, sono in grado di legare sia ER $\alpha$  che ER  $\beta$  (Kuiper GG et al, 1998) ma stimolano soprattutto ER $\beta$ . Genisteina e daidzeina sono presenti nella soia come  $\beta$ -D-glicosidi (genistina e daizina). Questi glicosidi sono biologicamente inattivi (Setchell KD, 1998) e vengono idrolizzati dalle  $\beta$ -glucosidasi batteriche e convertiti nelle corrispondenti forme bioattive. La daidzeina può poi essere metabolizzata ad equolo, il maggior metabolita circolante nei roditori (Figura 5).

E' ampiamente dimostrato che i fitoestrogeni svolgono un ruolo importante come antiossidanti (Siow RC et al, 2007), proteggendo le cellule dallo stress ossidativo e regolando l'espressione di diversi enzimi antiossidanti (Borras C et al, 2006). Grazie alle loro proprietà, i fitoestrogeni sono candidati in numerose terapie e sembrano svolgere un



ruolo importante nelle malattie cardiovascolari e nelle malattie neurodegenerative (Hsieh HM et al, 2011).

Inoltre diversi studi epidemiologici sulle popolazioni orientali hanno messo in evidenza una forte relazione tra assunzione giornaliera di fitoestrogeni e bassa percentuale di cancro (Ziegler RG et al, 2004; Goetzl MA et al, 2007). E' stato anche dimostrato che i fitoestrogeni, in particolare genisteina e daidzeina, mostrano effetti anti-apoptotici e portano ad un'aumento dell'efficienza respiratoria sia *in vitro* che *in vivo* (Rasbach KA and Schnellmann RG, 2008; Zhao L et al, 2009).

## 2. SCOPO DELLA TESI

Scopo della mia tesi è stato quello di:

1) Stabilire come l'attivazione della biogenesi mitocondriale, valutata attraverso l'aumento del numero di copie di mtDNA per cellula, sia implicata nella patogenesi e nell'espressione fenotipica della neuropatia ottica di Leber.

A tal fine, con l'ausilio della PCR quantitativa e della microdissezione con laser, abbiamo valutato l'ammontare ~~dell'mtDNA~~ di mtDNA in diversi tessuti (linfociti isolati da sangue periferico e tessuti oculari autoptici) di soggetti affetti, portatori sani non affetti e soggetti di controllo provenienti da famiglie affette da LHON.

2) Investigare gli effetti dell'attivazione selettiva del recettore estrogenico beta sull'induzioneattivazione della biogenesi mitocondriale e sul metabolismo energetico di cellule affette da LHON.

A tal fine abbiamo trattato ibridi derivati da pazienti affetti e da controlli con molecole di origine naturale ad azione estrogeno-simile (fitoestrogeni) e valutato gli effetti sulla vitalità, sulla biogenesi mitocondriale e sullo stress ossidativo. Gli studi sono stati eseguiti anche in seguito al blocco farmacologico di ER $\alpha$  e ER $\beta$  (attraverso l'utilizzo di inibitori selettivi) o in seguito al silenziamento delle due isoforme di ER.

### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1 Materiali utilizzati

Abbiamo studiato campioni ematici provenienti da soggetti di controllo, portatori sani e soggetti affetti di tre grandi famiglie con diagnosi di LHON, caratterizzate dalla mutazione m.11778G>A (dati demografici riassunti in Tabella 1). La famiglia 1 è una famiglia italo-brasiliana precedentemente descritta (Carelli V et al, 2006) composta da 25 soggetti affetti, 38 carrier e 54 soggetti di controllo (tutti coniugi non consanguinei). La famiglia 2 è una famiglia italiana precedentemente descritta (Carelli V et al, 2006) composta da 21 persone: 8 affetti, 8 carrier e 5 controlli. La famiglia 3 è di origine irlandese-americana composta da 17 persone: 2 affetti, 14 carrier e 1 controllo.

Abbiamo, inoltre, studiato i componenti appartenenti a 39 famiglie italiane portatrici delle tre mutazioni più frequenti nella LHON: m.11778G>A, m.3460G>A e m.14484T>C (dati demografici riassunti in Tabella 2).

Parallelamente allo studio condotto sui campioni ematici abbiamo studiato campioni oculari in paraffina provenienti da entrambi gli occhi di: 6 soggetti di controllo (**range fascia** di età 58-80 **anni**) ottenuti da Lions Eye Bank of Oregon (Portland, OR); un paziente LHON di 59 anni con **mutaazione** m.11778G>A e un portatore della mutazione m.11778G>A non affetto di 83 anni prelevati dopo la morte e caratterizzati in studi precedenti (Sadun AA et al, 2000; La Morgia C et al, 2010).

**Tabella 1**

Famiglia	Origini	Affetti	<b>Range Fascia di età (anni)</b>	Carrier	<b>FasciaRange di età (anni)</b>	Controlli	<b>FasciaRange di età</b>
Famiglia 1 (Carelli V et al, 2006)	Italo-brasiliana	22 maschi	15-84	12 maschi	37-79	28 maschi	21-75
		3 femmine	59-67	26 femmine	35-85	26 femmine	23-79
Famiglia 2 (Carelli V et al, 2006)	Italiana	6 maschi	21-64	1 maschio	47 anni	2 maschi	31-33
		2 femmine	25-68	7 femmine	36-67	2 femmine	27-29
Famiglia 3	Irlandese-americana	2 maschi	Non disponibile	7 maschi	Non disponibile	1 maschio	-
		-	-	7 femmine	Non disponibile	-	Non disponibile

- Formattato: SpazioPrima: 12 pt, Interlinea: singola
- Formattato: SpazioPrima: 12 pt
- Formattato: SpazioPrima: 12 pt, Interlinea: singola
- Formattato: SpazioPrima: 12 pt
- Formattato: SpazioPrima: 12 pt, Interlinea: singola
- Formattato: SpazioPrima: 12 pt
- Formattato: SpazioPrima: 12 pt, Interlinea: singola
- Formattato: Interlinea: singola
- Formattato: SpazioPrima: 12 pt
- Formattato: SpazioPrima: 12 pt
- Formattato: SpazioPrima: 12 pt
- Formattato: Interlinea: singola
- Formattato: SpazioPrima: 12 pt
- Formattato: SpazioPrima: 12 pt
- Formattato: SpazioPrima: 12 pt
- Formattato: SpazioPrima: 12 pt
- Formattato: SpazioPrima: 12 pt
- Formattato: SpazioPrima: 12 pt
- Formattato: SpazioPrima: 12 pt

**Tabella 2**

Genotipo	Numero di famiglie	Affetti	<b>FasciaRange di età (anni)</b>	Carrier	<b>FasciaRange di età (anni)</b>
m.11778G>A	24	28 maschi	9-79	12 maschi	36-75
		9 femmine	11-65	33 femmine	36-73
m.3460G>A	10	9 maschi	8-63	3 maschi	36-55
		10 femmine	10-80	12 femmine	36-82
m.14484T>C	5	6 maschi	15-58	-	-
		2 femmine	35-38	8 femmine	36-82

- Formattato: SpazioPrima: 12 pt, Interlinea: singola
- Formattato: SpazioPrima: 12 pt
- Formattato: SpazioPrima: 12 pt
- Formattato: SpazioPrima: 12 pt
- Formattato: SpazioPrima: 12 pt
- Formattato: SpazioPrima: 12 pt, Interlinea: singola
- Formattato: SpazioPrima: 12 pt
- Formattato: Interlinea: singola
- Formattato: SpazioPrima: 12 pt, Interlinea: singola
- Formattato: SpazioPrima: 12 pt, Interlinea: singola
- Formattato: SpazioPrima: 12 pt
- Formattato: Interlinea: singola
- Formattato: Interlinea: singola

### **3.2 Microdissezione con laser (LCM)**

Sezioni seriali da inclusioni in paraffina dei 6 soggetti di controllo, del soggetto affetto e del carrier sono state sottoposte a microdissezione con laser attraverso il sistema MMI NIKON UV-CUT.

Le sezioni sono state colorate con ematossilina-eosina o Luxol Fast Blue, osservate al microscopio, microdissecate con un laser UV e raccolte come descritto (Giordano C and d'Amati G, 2011). Tutti i tessuti microdissecati sono stati misurati e fotografati. Infine i campioni sono stati digeriti con proteinasi k (20µg/100µl) e processati per la valutazione del numero di copie ~~dell'mtDNA~~ di mtDNA.

### **3.3 Analisi del DNA mitocondriale**

Il numero di copie ~~dell'mtDNA~~ di mtDNA è stato valutato sul DNA estratto dai globuli bianchi periferici di soggetti di controllo, soggetti affetti e carrier (per l'estrazione è stato utilizzato il kit Total Wizard Genomic DNA Purification (Promega, Madison, WI, USA) basato su colonnine a scambio ionico) e dai tessuti precedentemente microdissecati tramite real-time PCR (AB 7500 Fast, Applied Biosystems, Warrington, UK) utilizzando un metodo precedentemente descritto (Cossarizza A et al, 2003) e modificato come segue. In breve, sono stati amplificati un frammento di mtDNA (nt 4625–4714) e un frammento di nDNA (gene FasL) utilizzando il sistema delle sonde TaqMan-MGB dell'Applied Biosystems (Primers e sonde sono descritte in Tabella 3). L'efficienza dell'amplificazione è stata determinata generando una curva standard (diluizioni seriali 1:10) di un plasmide

Formattato: Italiano (Italia)

nel quale i prodotti PCR sono stati clonati "tail to tail", in maniera da avere un rapporto di 1:1 delle molecole di riferimento.

**Tabella 3**

Gene	Assay ID
mtDNA	Forward: 5'-CACAGAAGCTGCCATCAAGTA-3' Reverse: 5'-CCGGAGAGTATATTGTTGAAGAGGA-3' Probe: 6-FAM-CAAGCAACCGCATCCA-MGB

Formattato: Inglese (Stati Uniti)

#### **3.4 Allestimento di cibridi trasmitocondriali**

Uno dei modelli cellulari classici per l'analisi delle mutazioni del mtDNA è quello dei cibridi trasmitocondriali. Queste cellule immortali, quindi facilmente manipolabili sono ottenute dalla fusione di citoplasmi (fibroblasti enucleati donatori di mtDNA mutato o wild-type) con cellule di osteosarcoma (143B/TK-) private dei propri mtDNA (Rho<sup>o</sup>) (King MP e Attardi G, 1989). I fibroblasti dei pazienti sono stati fatti crescere in dischi da coltura da 35 mm e sottoposti ad enucleazione. Il terreno è stato rimosso dai dischi, che sono stati capovolti e messi in tubi da centrifuga contenenti 30ml di DMEM, 2ml di FBS, e 0.32 ml di citocalasina B (1mg/ml). I tubi sono stati centrifugati per 40 minuti a 5800\*g. I dischi con i fibroblasti enucleati (citoplasti) sono stati lavati con DMEM per rimuovere i residui di citocalasina B. Ai fibroblasti enucleati sono state aggiunte le cellule Rho<sup>o</sup> (1-2x10<sup>-6</sup>) e lasciate aderire per circa 3 ore. In seguito i dischi sono stati lavati per tre volte con DMEM e ad essi è stata aggiunta una soluzione al 50% di polietilenglicole (PEG) per 60 secondi. Questa sostanza essendo altamente tossica viene rimossa rapidamente e le

Formattato: Italiano (Italia)

cellule dopo essere state lavate per 2-3 volte sono state nutrite con terreno permissivo alla crescita di tutte le cellule presenti. Dopo 24 ore le cellule sono state tripsinizzate e piastrate a bassa densità (da un disco da 35 mm in 15-20 dischi da 100mm), e nutrite con un terreno selettivo contenente DMEM, 8% di FBS dializzato, 100µg/ml di bromodeossiuridina e puromicina. Le cellule donatrici dei mitocondri (i fibroblasti dei pazienti e dei controlli) sono timidina chinasi positive (TK+) e sintetizzano uridina (UR+), le cellule riceventi (Rho°) sono TK- e UR-; i cibridi ottenuti dalla fusione vengono selezionati per la loro capacità di crescere in assenza di uridina (che seleziona le cellule Rho° non fuse) e in presenza di bromodeossiuridina (che seleziona i fibroblasti non enucleati). Le cellule sono state nutrite a giorni alterni, e dopo circa 10-14 giorni in terreno selettivo i cloni cibridi raggiungono una grandezza sufficiente da essere visibili ad occhio nudo, ed essere isolati utilizzando degli anellini di diametro pari a 5mm. Per ogni soggetto (paziente o controllo) sono stati ottenuti diversi cloni stabili, di cui 2 sono stati scelti per lo studio.

Formattato: Italiano (Italia)

### **3.5 Condizioni di crescita**

Le cellule sono state coltivate in DMEM-glutamax con l'aggiunta di 10% FBS, 110 mg/mL sodio piruvato e aminoacidi, 100 U/ml penicillina and 100 mg/ml streptomina (chiamato per semplicità glucosio), in atmosfera umidificata (5% CO<sub>2</sub>) a 37°C. Gli esperimenti sono stati eseguiti nel medesimo mezzo di coltura oppure in DMEM-glucose free, con l'aggiunta di 5 mM di galattosio, 10% FBS dializzato, 110 mg/mL sodio piruvato e aminoacidi, 100 U/ml penicillina and 100 mg/ml streptomina (chiamato galattosio) nelle stesse condizioni ambientali. Le cellule sono state trattate con diverse molecole: 17β-Estradiolo (E2), Genisteina (G), Daidzeina (D) ed Equolo (Eq) (Sigma-Aldrich), e antagonisti dei recettori per gli estrogeni: ICI 182780 (antagonista di entrambi i sottotipi), MPP (methyl-piperidino-pyrazole, antagonista selettivo per ERα) e PHTPP (4-[2-phenyl-

Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Italiano (Italia)

5,7-bis (tri-fluoro-methyl) pyrazolo [1,5-a]pyrimidin-3-yl] phenol, antagonista selettivo per ER $\alpha$ ) (Tocris Bioscience). E2 ed ICI sono stati sciolti in etanolo assoluto ad una concentrazione di 100 $\mu$ M; G, D, Eq, MPP e PHTPP sono stati sciolti in DMSO ad una concentrazione di 100 $\mu$ M, 3.9mM, 100M $\mu$ , 100 $\mu$ M, 33 $\mu$ M rispettivamente. Tutte le molecole sono state diluite ad una concentrazione di 100nM nel terreno di crescita immediatamente prima del trattamento. Le cellule non trattate sono state mantenute nelle stesse concentrazioni finali di etanolo e DMSO. ICI, MPP e PHTPP sono stati aggiunti 30 minuti prima di G+D+Eq.

Formattato: Italiano (Italia)

### **3.6 Curve di crescita**

Per valutare la capacità di crescita dei ibridi abbiamo piastrato 30x10<sup>4</sup> cellule in dischi da 60mm. Il numero di cellule vitali (selezionate tramite il marcatore Trypan blue) nelle due condizioni di crescita (glucosio e galattosio) è stato contato dopo 24 e 48 ore. Ad ogni step il numero di cellule vive in galattosio è stato normalizzato verso il numero di cellule vive in glucosio.

Formattato: Italiano (Italia)

### **3.7 Apoptosi**

Per valutare il livello di apoptosi abbiamo piastrato 1.5x10<sup>5</sup> cellule in dischi da 60mm e il livello dell'apoptosi è stato valutato dopo 24 ore di trattamento con E2 o G+D+Eq nelle due condizioni di crescita (glucosio e galattosio). Le cellule sono state tripsinizzate velocemente, incubate con APC/annessinaV (Becton Dickinson) e analizzate al citofluorimetro.

Formattato: Italiano (Italia)

### **3.8 Analisi ultrastrutturale e istomorfometrica**

Le cellule sono state cresciute in glucosio e trattate con G+D+Eq o con E2. Dopo 24 ore di trattamento le cellule sono state lavate con PBS e poi con gluteraldeide tamponata 2.5X.

Formattato: Italiano (Italia)



Dopo il lavaggio le cellule sono state raccolte, sotto forma di pellet, con gluteraldeide tamponata 2.5X e mantenute a 4°C per un minimo di 4 ore ad un massimo di 24 ore. Successivamente le cellule sono state post-fissate in tetrossido di osmio ed incluse in resina epossidica. I retini sono stati colorati con acetato di uranile e citrato di piombo e osservati con il microscopio elettronico a trasmissione Zeiss EM 10 T.E.M. (DigitalMicrograph 3.4TM). Sono state fotografate e acquisite 20 immagini ad alta risoluzione (8000X) di ogni condizione ed in seguito è stata effettuata un'analisi morfometrica utilizzando il software ImageJ 64 1.48 c.

### 3.9 Analisi dell'espressione genica

E' stata analizzata l'espressione genica dei cibridi in condizioni basali e in seguito al trattamento per 24 ore con G+D+Eq. L'RNA è stato estratto attraverso il kit SV Total RNA isolation (Promega, Madison, WI, USA) basato su colonnine a scambio ionico, quantizzato tramite spettrofotometro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington) e retrotrascritto (0.1-1 mg) attraverso un kit standardizzato (Life technologies). Per l'analisi successiva è stata utilizzata la chimica delle sonde FAM-TaqMan-MGB. Abbiamo valutato i livelli di espressione genica di *PPRC1* (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator-related 1*), *TFAM* (*mitochondrial transcription factor A*), *NRF1* (*nuclear respiratory factor 1*), *PGC1 $\alpha$*  (*PPAR- $\alpha$  coactivator 1-  $\alpha$* ), *MTCOI* (*cytochrome c oxidase COX subunits I*), *MTND6* (*NADH dehydrogenase subunit 6*), *COIV* (*nuclear-encoded COX subunit IV*) e *SOD2* (*superoxide dismutase 2, mitochondrial*) (utilizzando saggi inventoriati Life technologies elencati in Tabella 4) In ogni campione per ogni gene è stata valutata l'espressione relativa rispetto a un gene di controllo (18S) utilizzando il metodo del  $\Delta\Delta C_t$ . Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato.

Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Tipo di carattere: Corsivo

Formattato: Tipo di carattere: Corsivo

Formattato: Tipo di carattere: Corsivo

Formattato: Tipo di carattere: Corsivo

Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Tipo di carattere: Corsivo

Formattato: Tipo di carattere: Corsivo

Formattato: Tipo di carattere: Corsivo

Formattato: Tipo di carattere: Corsivo

Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Tipo di carattere: Corsivo, Italiano (Italia)

Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Italiano (Italia)

**Tabella 4**

<b>Gene</b>	<b>Assay ID</b>
18S	Hs99999901_s1
PPRC1	Hs00209379_m1
PGC1 $\alpha$	Hs01016721_m1
TFAM	Hs01082775_m1
COXI	Hs02596864_g1
ND6	Hs02596879_g1
COXIV	Hs00971639_m1
SOD2	Hs00167309_m1

### **3.10 Analisi dell'espressione proteica**

Per l'estrazione delle proteine dalle colture cellulari si è proceduto lavando due volte i pellets e lisandoli in un buffer così composto: 50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodio deossicolato, 1% SDS (sodium dodecyl sulfate), 1 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride), 10 mg/ml aprotinina, 10 mg/ml leupeptina and 10 mg/ml pepstatina. Successivamente è stata effettuata una centrifuga a 14000g per 10 minuti a 4°C per eliminare eventuali residui. Dopo aver stabilito la concentrazione delle proteine tramite

Formattato: Italiano (Italia)

saggio BCA (bicinchoninic acid, Beyotime Biotechnology) e stata analizzata l'espressione proteica mediante Western Blot. 30 o 40  $\mu\text{g}$  di proteine sono state separate su gel di acrilamide al 12% (SDS-PAGE) e trasferite su membrana di nitrocellulosa. Gli anticorpi primari sono stati visualizzati utilizzando anticorpi secondari coniugati con la perossidasi di rafano (Dako). Il segnale è stato rilevato tramite chemiluminescenza potenziata (Amersham Biosciences). Gli anticorpi usati sono i seguenti: Anti- $\beta$ Actina (Sigma-aldrich), Anti-SOD2 (abcam), Anti-ER $\beta$  (Calbiochem), Anti-ER $\alpha$ , Anti-mtTFA e Anti-NRF1 (Santa Cruz Biotechnology).

Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Italiano (Italia)

### **3.11 Consumo di ossigeno**

Il consumo di ossigeno è stato misurato su  $5 \times 10^6$  cellule integre, dopo averle incubate nei due mezzi di coltura, glucosio e galattosio, e trattate con E2 o G+D+Eq per 24 ore. Per l'analisi è stato utilizzato l'elettrodo di Clark (Hansatech). Le cellule, al momento della misurazione, sono state mantenute in DMEM addizionato con 10% di sodio piruvato, substrato della catena respiratoria. Mediante ossigrafo è possibile rilevare il consumo di ossigeno come femtomoli di ossigeno consumate da una cellula ogni minuto (fmol/cell/min).

Formattato: Italiano (Italia)

### **3.12 Sintesi di ATP**

Le cellule sono state trattate per 24 ore con G+D+Eq in condizioni basali o in terreno con galattosio. Allo scadere dei trattamenti le cellule sono state lisate con l'apposito buffer di lisi (150 mM KCl, 25 mM Tris, 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 7.4). Una parte dei lisati è stata utilizzata per la quantizzazione delle proteine, mentre ai lisati restanti è stata aggiunta digitonina (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in agitazione per 1 minuto. Le cellule sono state centrifugate a 13000 rpm per 1 minuto e risospese nello stesso buffer. In fine è stato aggiunto il

Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Italiano (Italia)

substrato luciferasi/luciferina (Sigma-Aldrich) e la luminescenza è stata letta mediante Bio Orbit 1250 Luminometer. Per la misurazione sono stati usati diversi substrati: 1 mM di piruvato e 1 mM di malato per il Complesso I (CI); 5 mM di succinato e 5  $\mu$ M di rotenone per il Complesso II (CII). I dati sono stati normalizzati per la concentrazione di proteine di ciascun campione.

### **3.13 Analisi dei livelli di superossido mitocondriale ROS**

Formattato: Italiano (Italia)

I ROS sono stati misurati su cellule vive utilizzando la sonda MitoSox Red (Life technologies). Per l'analisi di immunofluorescenza sono state piastrate  $35 \times 10^4$  cellule in dischi da 35mm appositi per l'analisi di fluorescenza (Ibidi). Dopo 24 ore di crescita in condizioni basali (glucosio) le cellule sono state trattate con G+D+Eq per 1 ora in glucosio. Dopo il trattamento le cellule sono state incubate per 15 minuti al buio e a 37°C con una soluzione di MitoSox Red 5 $\mu$ M e successivamente sottoposte a due lavaggi con un tampone salino contenente calcio e magnesio. Infine la fluorescenza è stata analizzata attraverso un microscopio invertito. Per lo studio di citofluorimetria le cellule sono state piastrate in dischi da 60mm e mantenute per 24 ore in glucosio fino a raggiungere una confluenza del 50-60%. A questo punto le cellule sono state trattate per 1 ora con G+D+Eq in glucosio e poi incubate per 30 minuti con una soluzione di MitoSox Red 5 $\mu$ M al buio e a 37°C. Al termine dell'incubazione le cellule sono state lavate con un tampone salino contenente calcio e magnesio ed analizzate al citofluorimetro.

### **3.14 Silenziamento di ER $\alpha$ ed ER $\beta$**

Per gli esperimenti di silenziamento le cellule sono state piastrate in dischi da 60mm in un terreno privo di antibiotici e dopo 24 ore sono state silenziate con 60pmol di siRNA (ESR1 per ER $\alpha$ , ESR2 per ER $\beta$ , CTRL-, Life technologies) tramite l'agente trasfettante

Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Italiano (Italia)

Lipofectamine™ RNAiMAX (Life technologies). L'RNAi e la lipofectamina, sono stati opportunamente diluiti in terreno OptiMEM (Life technologies). Alla soluzione contenente la lipofectamina è stata aggiunta quella contenente l'RNAi e sono state lasciate in incubazione a temperatura ambiente per 20 minuti in modo da favorire la formazione dei complessi Reagente-RNA. Il preparato è stato aggiunto alle cellule da trasfettate (alle quali era stato preventivamente tolto il terreno) e le cellule sono state messe in incubazione a 37°C per circa 4 ore. Trascorso questo periodo è stato aggiunto terreno completo alle cellule, incubate per 24 ore e successivamente trattate per gli studi di vitalità cellulare. Per valutare l'efficienza di trasfezione è stata verificata l'aumento dell'espressione proteica tramite Western Blott.

### **3.15 Analisi statistiche**

I dati rilevati sono espressi come media  $\pm$  SEM (errore standard). Per l'analisi statistica sono state utilizzate metodiche ANOVA o t-test. I risultati sono stati considerati significativi per valori  $p < 0.05$

Formattato: Italiano (Italia)

## 4. RISULTATI

### **4.1 Valutazione della biogenesi mitocondriale in tessuti di soggetti affetti e portatori non affetti**

#### **4.1**

Formattato: Normale, Nessun elenco puntato o numerato

#### **4.1.1 L'analisi di tre famiglie LHON rivela un aumento del numero di copie di mtDNA dei linfociti periferici, particolarmente nei portatori non affetti.**

Formattato: Italiano (Italia)

Per prima cosa abbiamo valutato il numero di copie di mtDNA in globuli bianchi periferici provenienti da soggetti affetti, carrier e soggetti di controllo provenienti da tre famiglie affette (i dati delle famiglie sono riportati in Tabella 1), due delle quali precedentemente descritte (Carelli V et al, 2006). I risultati ottenuti, confrontando i dati relativi a tutte e tre le famiglie studiate, mostrano che sia i carrier che i soggetti affetti presentano un contenuto di mtDNA (espresso come numero di copie ~~dell'~~mtDNA di mtDNA per cellula) significativamente maggiore rispetto ai controlli e che i carrier, in particolare, hanno un contenuto di mtDNA maggiore (Figura 6A).

Per estendere questi risultati, abbiamo valutato il numero di copie di mtDNA di 64 affetti e 68 carrier provenienti da 39 famiglie italiane affette (i dati demografici sono riportati in Tabella 2) che presentano le tre mutazioni puntiformi più frequenti nella LHON

(m.11778G>A, m.3460G>A e m.14484T>C). Anche in questo caso abbiamo evidenziato un maggior contenuto di mtDNA nei carrier rispetto agli individui malati (Figura 6B).

Successivamente per confermare l'attivazione della biogenesi mitocondriale nei globuli bianchi periferici, abbiamo effettuato una serie di esperimenti da un sottoinsieme limitato di soggetti (9 controlli, 8 affetti, 9 carrier) appartenenti ad una delle famiglie italiane. Per prima cosa abbiamo valutato il contenuto di mtDNA, espresso come numero di copie di mtDNA per cellule, che risulta aumentato in modo significativo nei soggetti malati e soprattutto nei carrier (Figura 6C). Inoltre, su questi campioni, è stata valutata anche l'espressione genica dei principali regolatori della biogenesi mitocondriale: *PPRC1*, *TFAM* ed *NRF1*, osservando un aumento sia nei soggetti affetti che, in modo significativo, nei carrier rispetto ai controlli (Figura 6D). Nel complesso questi dati evidenziano una marcata attivazione della biogenesi mitocondriale associata con un aumento del numero di copie dell'~~mtDNA~~di mtDNA nei carrier rispetto ai controlli.

**Commentato [L1]:** Ripeti molte volte il termine affetto in questa prima parte...sostituiscilo qua e la con un "malati" oppure "che esprimono il fenotipo patologico" tanto per variare un po.

**Commentato [L2]:** È espressione genica quindi userei il corsivo

#### ***4.1.2 L'analisi del numero di copie di mtDNA nella retina suggerisce che le RGC della macula, target principale della LHON, hanno un alto fabbisogno energetico***

Successivamente abbiamo indagato il contenuto di mtDNA nel tessuto colpito principalmente dalla malattia, quello oculare. Abbiamo studiato, attraverso la microdissezione con laser, sezioni sagittali retiniche di due soggetti di controllo e un carrier. È stato selettivamente microdissecato lo strato delle RGC, colpite selettivamente nella LHON, in due posizioni equidistanti dalla testa del nervo ottico (ONH), un'area della macula e un'area della regione nasale (Figura 7A e 7B). Il rapporto tra l'area della macula e l'area nasale mostra che il contenuto di mtDNA (espresso come copie del mtDNA per nucleo delle RGC) della regione della macula è maggiore rispetto alla regione nasale sia nei controlli che nel carrier. Inoltre il carrier mostra un rapporto più alto (Figura 7C).

Questi risultati suggeriscono che le RGC della macula, che danno origine agli assoni che entrano nella porzione temporale del nervo ottico, punto di inizio della neurodegenerazione nella LHON (Sadun AA et al, 2000), sono le cellule con il maggior fabbisogno energetico. In aggiunta, l'osservazione che il carrier mostra un rapporto maggiore rispetto ai controlli, riflette una possibile compensazione nelle RGC della macula.

#### **4.1.3 Il pattern di degenerazione nel nervo ottico segue il gradiente di distribuzione**

##### ***dell' mtDNA di mtDNA negli assoni***

Abbiamo sezionato parti della testa del nervo ottico anteriore alla lamina cribrosa e porzioni mieliniche posteriori alla lamina. Questo perché la mielinizzazione degli assoni delle RGC, che escono dalla lamina cribrosa, è associata ad una marcata riduzione nel numero dei mitocondri (Carelli et al, 2004; Andrews et al, 1999; Barron et al, 2004; Pan et al, 2012). Sono state utilizzate sezioni sagittali provenienti da 4 controlli ed un carrier; non abbiamo valutato l'individuo affetto per la presenza di una estesa gliosi.

Come ci aspettavamo, la valutazione della densità dell' mtDNA di mtDNA (espresso come molecole di mtDNA per  $\mu\text{m}^3$ ) mostra che, sia nei controlli che nel carrier, la porzione pre-laminare ha un numero di copie di mtDNA maggiore rispetto alla porzione post-laminare (di circa 2.5 volte). Inoltre il rapporto tra porzione pre-laminare e post-laminare è più basso nel carrier rispetto ai controlli. Questa situazione potrebbe riflettere un aumento del numero di copie dell' mtDNA di mtDNA negli assoni mielinici della porzione post-laminare del carrier (Figura 8B).

Successivamente abbiamo analizzato porzioni della regione post-laminare del nervo ottico. Nella LHON il processo neurodegenerativo inizia dal settore temporale, che si compone principalmente dei piccoli assoni del fascio papillomaculare, continua poi nella regione

Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Italiano (Italia)



centrale, risparmiando le porzioni delle regioni superiori, nasali e inferiori, come mostrato nelle sezione trasversale dei soggetti in esame (Figura 8C). Abbiamo microdissecato campioni dal quadrante temporale, nasale, inferiore e superiore del nervo ottico (Figura 8D). I risultati dei 12 nervi ottici di controllo (6 individui) mostrano che la regione temporale presenta la densità più bassa di copie di mtDNA (espresso come molecole di mtDNA per  $\mu\text{m}^3$ ), mentre la porzione nasale ed inferiore la densità di mtDNA più alta. Abbiamo analizzato le stesse aree anche nel carrier in cui è risultata presente la stessa distribuzione della densità dell' mtDNA nelle varie regioni studiate (Tabella 5). Inoltre abbiamo verificato che il carrier mostra una lieve riduzione dei rapporti inferiore/temporale, superiore/temporale e nasale/temporale paragonati agli stessi rapporti dei controlli (Figura 12E), indicando un aumento compensatorio della densità dell' mtDNA nel settore temporale, rispetto agli altri settori dello stesso nervo.

Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Italiano (Italia)

**Tabella 5**

Campione	Area temporale (media $\pm$ SEM)	Area superiore (media $\pm$ SEM)	Area nasale (media $\pm$ SEM)	Area inferiore (media $\pm$ SEM)
<b>Controlli</b>	1,159 $\pm$ 0,110	1,665 $\pm$ 0,230	3,871 $\pm$ 0,770	4,665 $\pm$ 1,300
<b>Carrier</b>	1,050	0,970	3,140	3,800

#### 4.2 Valutazione degli effetti dei fitoestrogeni sulla metabolismo cellulare nella LHON

#### ***4.2.1 I fitoestrogeni migliorano la vitalità cellulare riducendo l'apoptosi***

Per i nostri studi abbiamo utilizzato 2 linee di cibridi di controllo (WT) e due cloni di cibridi portatori della mutazione primaria 11778/ND4 (11778). I cibridi mutati e di controllo sono stati mantenuti per 24 e 48 ore in due condizioni di crescita: una condizione normale (in presenza di glucosio) e una condizione di stress (in presenza di galattosio che costringe le cellule ad utilizzare la fosforilazione ossidativa come fonte di ATP). Sono stati trattati con: 1) 100nM di 17- $\beta$  estradiolo (E2); 2) 100nM di tre fitoestrogeni (genisteina G, daidzeina D, equolo Eq); 3) una combinazione delle tre molecole di fitoestrogeni (G+D+Eq, 100nM di ogni molecola). Dopo 48 ore di incubazione in galattosio i cibridi mutati mostrano una marcata riduzione del numero di cellule vive rispetto ai cibridi di controllo (Figura 9A). Tutti i trattamenti portano ad un significativo aumento della vitalità cellulare nei cibridi LHON ma il trattamento con ~~la mix di~~ G+D+Eq, in modo simile a E2, ha un effetto migliore e significativo rispetto all'effetto delle singole molecole (Figura 9A). Per verificare se la maggiore efficacia della ~~mix-combinazione~~ di G+D+Eq sulla vitalità cellulare non fosse dovuta alla loro concentrazione complessiva ma all'effetto combinato delle tre molecole, abbiamo verificato l'efficienza di G, D ed Eq ad una concentrazione di 300nM (la concentrazione finale delle tre molecole quando somministrate in combinazione). Come si vede dalla Figura 9B, solo il trattamento con 300nM di D porta ad un aumento della vitalità, ma non paragonabile all'effetto della ~~mix-combinazione dei~~ fitoestrogeni, mentre il trattamento con 300nM di E2, G e di Eq non influenza la vitalità dei cibridi mutati cresciuti in galattosio. E' da sottolineare che il trattamento con tutte le molecole e con la combinazione dei fitoestrogeni non comporta nessun cambiamento nella crescita in glucosio dei cibridi di controllo (Figura 9C). Questi risultati sono in accordo con

le osservazioni che una combinazione di G+D+Eq ha un effetto maggiore rispetto agli effetti delle singole molecole (Zhao L et al, 2009).

Per provare che il miglioramento nella vitalità cellulare, indotta dalla combinazione di G+D+Eq fosse correlata ad una riduzione della morte cellulare, abbiamo incubato le cellule con l'annessina V e valutato la percentuale di cellule in apoptosi. Dopo 24 ore in galattosio i ibridi mutati mostrano un notevole aumento del tasso apoptotico rispetto ai ibridi di controllo (Figura 6D). L'incubazione con G+D+Eq, in modo analogo a E2, riduce significativamente il tasso di cellule in apoptosi (Figura 9D), confermando l'effetto significativo sulla vitalità.

#### ***4.2.2 La combinazione di fitoestrogeni induce la biogenesi mitocondriale***

Per valutare l'effetto della combinazione di G, D, ed Eq sulla biogenesi mitocondriale abbiamo misurato la densità mitocondriale delle cellule attraverso un'analisi ultrastrutturale. Abbiamo inizialmente verificato il numero e l'area occupata dai mitocondri e l'area media dei singoli mitocondri nei ibridi di controllo e in quelli mutati cresciuti in glucosio. Come mostrato in Figura 10A,C,E i ibridi patologici presentano una riduzione significativa sia del numero che dell'area totale occupata dai mitocondri rispetto ai ibridi di controllo ma non dell'area media dei singoli mitocondri. Abbiamo poi investigato l'effetto di G+D+Eq e di E2 dopo 24 ore di incubazione. Entrambi i trattamenti portano ad un significativo aumento del numero e dell'area dei mitocondri rispetto alle cellule non trattate sia nei ibridi mutati che in quelli di controllo (Figura 10B e 10D); rimane pressochè invariata, invece, l'area media dei singoli mitocondri (Figura 10F).

Abbiamo, inoltre, valutato i livelli di espressione genica dei principali regolatori della biogenesi mitocondriale: *PGC1 $\alpha$* , *TFAM* ed *NRF1*. Dopo 24 ore di trattamento con

G+D+Eq in glucosio abbiamo osservato una significativa induzione dei geni sia nei ibridi di controllo che nei ibridi mutati (Figura 10H). Parallelamente all'aumento dell'espressione genica, abbiamo osservato anche un aumento dell'espressione proteica di TFAM ed NRF1 (Figura 10I). Un aumento analogo si osserva anche per i geni codificanti per la catena respiratoria mitocondriale: *MTCOI*, *MTND6*, *COIV* (Figura 10L). Sia i dati ultrastrutturali che i dati sull'espressione genica evidenziano come la combinazione dei fitoestrogeni porti ad un'induzione della biogenesi mitocondriale, aumentando la densità dei mitocondri presenti nelle cellule, e attivando i principali regolatori della biogenesi mitocondriale.

#### ***4.2.3 La combinazione di fitoestrogeni migliora le competenze energetiche***

L'aumento della vitalità cellulare è correlata con un miglioramento dello stato bioenergetico dei ibridi. Infatti, il trattamento con la combinazione di G+D+Eq per 24 ore induce un significativo aumento della percentuale del consumo di ossigeno sia in condizioni normali (glucosio) che in condizioni di stress metabolico (galattosio) (Figura 11A). In aggiunta si osserva un aumento, anche se non significativo, della sintesi di ATP nei ibridi mutati dopo 24 ore di incubazione con G+D+Eq (Figura 11B).

#### ***4.2.4 I fitoestrogeni riducono i livelli di superossido mitocondriale e ~~ROS~~ e aumentano i livelli di SOD2***

In seguito abbiamo investigato il ruolo dei fitoestrogeni nello stress ossidativo. La generazione di specie reattive dell'ossigeno è stata valutata mediante l'uso del MitoSox Red, indicatore di superossido mitocondriale, attraverso studi di citofluorimetria e di immunofluorescenza. In condizioni basali i ibridi mutati presentano un maggiore livello di

superossido~~ROS~~, misurati come aumento di MFI (Mean Fluorescence Intensity), rispetto ai cibridi di controllo (Figura 12A). Dopo 1 ora di trattamento con la combinazione di fitoestrogeni la produzione basale di ROS~~superossido~~ si riduce nei mutati (Figura 12A). Situazione analoga è stata osservata anche in immunofluorescenza; anche in questo caso il trattamento con G+D+Eq riduce notevolmente i livelli di superossido~~ROS~~ nei cibridi mutati (Figura 12B).

Parallelamente agli studi svolti ad investigare i livelli di superossido~~ROS~~, abbiamo valutato anche l'espressione della SOD2, principale enzima antiossidante mitocondriale, in condizioni basali. Il trattamento per 24 ore con G+D+Eq porta ad un lieve aumento dell'espressione genica nei controlli ed ad un aumento più significativo nei cibridi patologici (Figura 12D). Quest'aumento è stato osservato anche nell'espressione della proteina nei cibridi mutati e di controllo (Figura 12E).

#### ***4.2.5 L'azione dei fitoestrogeni è mediata da ER $\beta$***

Al fine di analizzare i ruoli specifici delle isoforme del recettore per gli estrogeni ed investigare quale delle due sia implicata negli effetti osservati con la somministrazione della combinazione specifica dei fitoestrogeni, abbiamo usato antagonisti selettivi per ER $\alpha$  ed ER $\beta$  e successivamente bloccato l'espressione di entrambi attraverso l'utilizzo di siRNA specifici.

Abbiamo bloccato farmacologicamente ER $\alpha$  ed ER $\beta$  attraverso antagonisti selettivi: rispettivamente MPP e PHTPP, ed entrambe le isoforme attraverso l'utilizzo dell'ICI 182780. Si osserva che la pre-incubazione con 100nM di ICI inibisce completamente l'azione benefica della combinazione~~mix~~ dei fitoestrogeni sulla vitalità cellulare nei cibridi mutati; situazione analoga si osserva anche dopo la pre-incubazione di 100nM di PHTPP.

Formattato: Italiano (Italia)

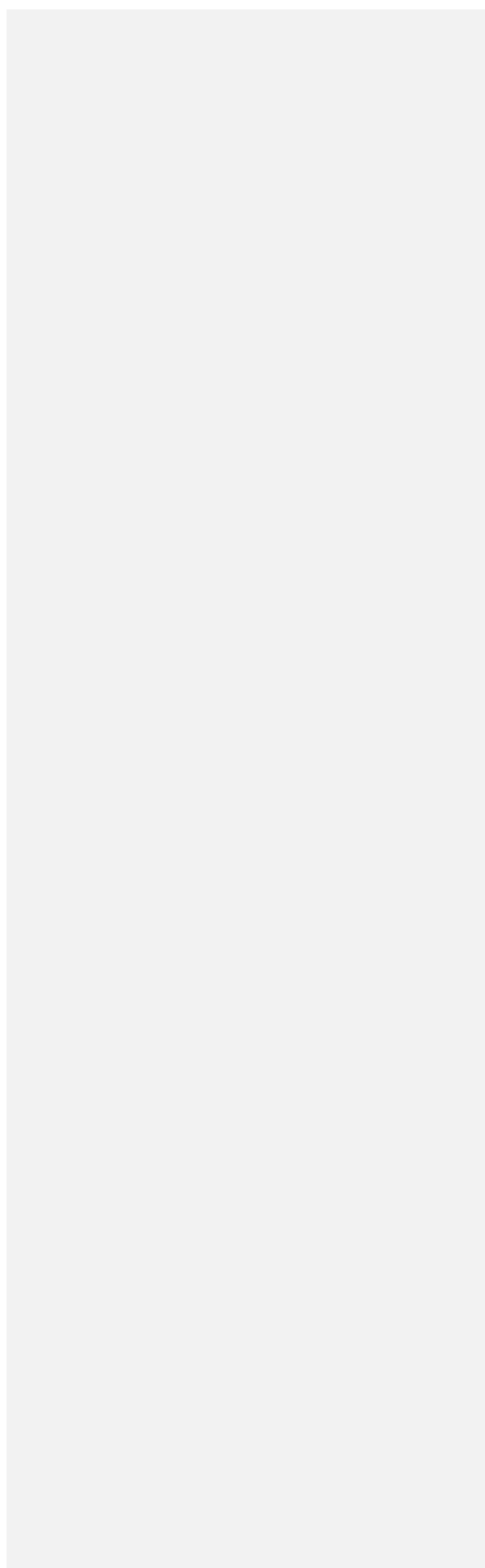
Al contrario il blocco farmacologico di ER $\alpha$ , attraverso la pre-incubazione con 100nM di MPP, non altera l'effetto di G+D+Eq (Figura 13A).

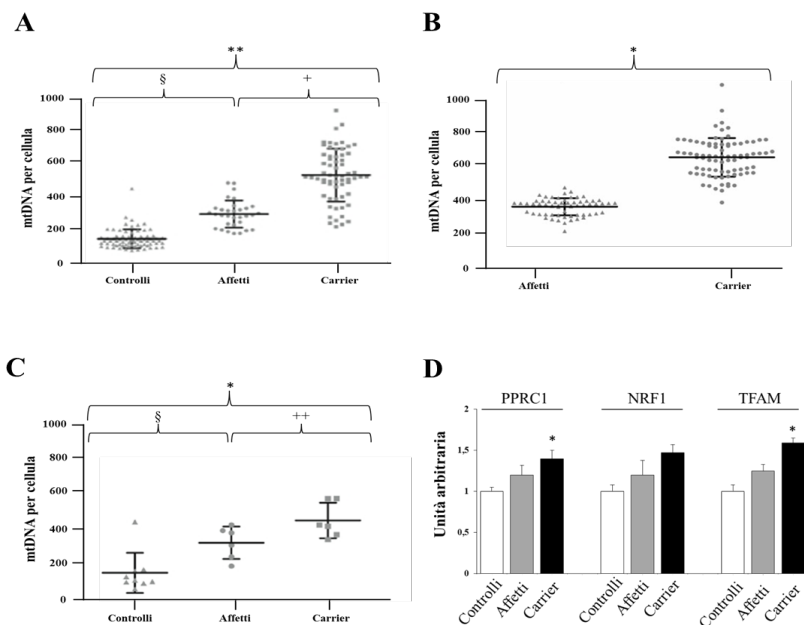
Parallelamente abbiamo silenziato ER $\alpha$  e ER $\beta$  in modo transiente con siRNA specifici e testato l'azione ~~della mix dei fitoestrogeni~~ G+D+Eq in seguito al silenziamento dei recettori. Come si vede in Figura 10B le cellule incubate per 24 ore con G+D+Eq, e precedentemente silenziate per ER $\alpha$  (siRNA ESR2), non mostrano nessun miglioramento nella loro vitalità quando cresciute in condizioni stressanti. Al contrario, la combinazione mix di fitoestrogeni mostra un effetto benefico sulla crescita cellulare se somministrata alle stesse cellule ma silenziate con un siRNA vuoto (siRNA CTRL -) (Figura 13B). Quando le cellule vengono silenziate per ER $\beta$  (siRNA ESR1), la combinazione di G+D+Eq ha un effetto benefico sulla vitalità delle cellule dopo 24 ore di crescita in galattosio, anche se in misura minore rispetto all'effetto che si osserva quando non viene silenziata nessuna isoforma di ER (un recupero di circa il 50% rispetto al recupero di circa l'80%) (Figura 13B).

Questi dati suggeriscono che l'azione dei fitoestrogeni è mediata da ER, in particolare dal sottotipo  $\alpha$ , dal momento che l'effetto di G+D+Eq viene annullato quando ER $\alpha$  è bloccato farmacologicamente o silenziato. Tale annullamento non si verifica quando viene bloccato o silenziato ER $\beta$ . L'efficienza di trasfezione è stata valutata attraverso Western Blot (Figura 13C). Ulteriori analisi su entrambi i sottotipi recettoriali sono in corso di studio.



**Figura 6**





**Figura 6: L'analisi di tre famiglie LHON rivela un aumento del numero di copie di mtDNA dei linfociti periferici, particolarmente nei portatori non affetti.** Valutazione del numero di copie di mtDNA e della biogenesi mitocondriale in campioni ematici.

(A) Il contenuto di mtDNA è espresso come numero di copie dell' mtDNA per cellula. I dati rappresentano la media  $\pm$  SEM di tre esperimenti e si riferiscono a soggetti di controllo, soggetti affetti e carrier appartenenti a tre grandi famiglie affette dalla LHON (caratterizzate dalla mutazione m.11778G>A).  $\S$ Affetti vs controlli  $p < 0.0001$ ,  $^+$ carrier vs controlli  $p < 0.00001$ ,  $^{**}$ carrier vs affetti  $p < 0.0001$  (Anova).

(B) Il contenuto di mtDNA è espresso come numero di copie dell' mtDNA per cellula. I dati rappresentano la media  $\pm$  SEM di tre esperimenti e si riferiscono a soggetti affetti e carrier appartenenti a 39 famiglie italiane affette dalla LHON (mutazioni m.11778G>A, m.3460G>A, m.14484T>C).  $^*$ carrier vs affetti  $p < 0.0001$  (Anova).

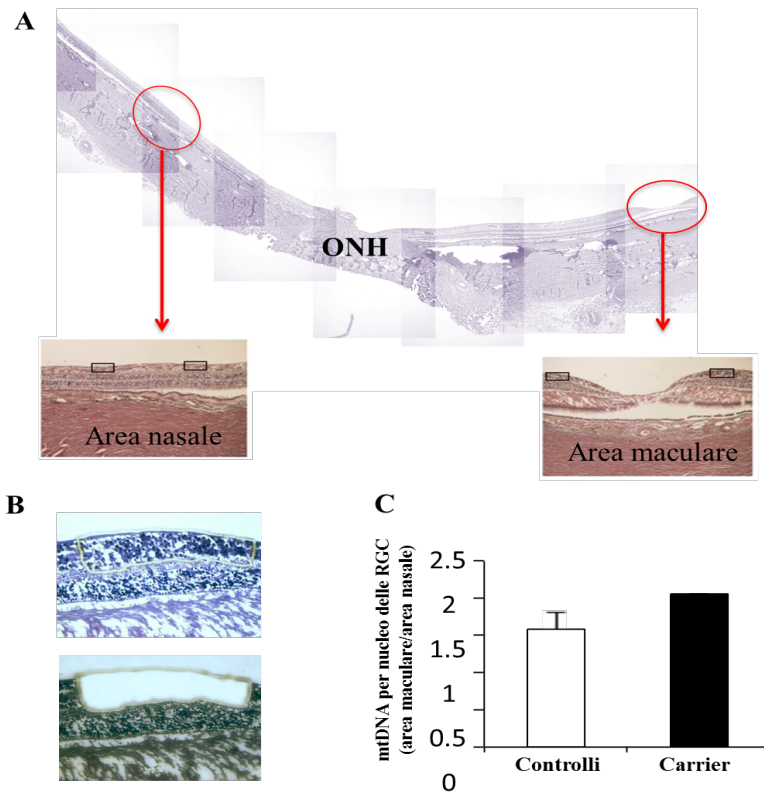
(C) Il contenuto di mtDNA è espresso come numero di copie dell' mtDNA per cellula. I dati rappresentano la media  $\pm$  SEM di tre esperimenti e si riferiscono a soggetti di controllo, soggetti affetti e carrier appartenenti ad una famiglia italiana.  $\S$ affetti vs controlli  $p < 0.01$ ,  $^{++}$ carrier vs controlli  $p < 0.001$ ,  $^*$ carrier vs affetti  $p < 0.05$  (Anova).

(D) Espressione genica dei principali regolatori della biogenesi relative a soggetti di controllo, soggetti affetti e carrier appartenenti ad una famiglia italiana. I dati rappresentano la media  $\pm$  SEM di tre esperimenti.  $^*$ carrier vs controlli  $p < 0.05$  (Anova).

Formattato: Italiano (Italia)  
 Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Grassetto, Non Corsivo  
 Formattato: Italiano (Italia)



**Figura 7**



**Figura 7: L'analisi del numero di copie di mtDNA nella retina suggerisce che le RGC della macula, target principale della LHON, hanno un alto fabbisogno energetico**

**Valutazione del numero di copie di mtDNA in campioni di retina.**

(A) Montaggio rappresentativo di sezioni orizzontali della testa del nervo ottico (ONH) e della macula. I cerchi rossi indicano l'area nasale e della macula, equidistanti da ONH, dove le RGC sono state microdisseccate per valutare il numero di copie dell'~~mtDNA~~ di mtDNA (ematossilina eosina, scale bar = 200 mm).

(B) Immagini rappresentative della retina prima e dopo la microdissezione con laser delle RGC (ematossilina eosina, scale bar = 100mm).

(C) Il contenuto di mtDNA, indicato come copie del mtDNA per nucleo delle RGC, è espresso come rapporto tra l'area della macula e l'area nasale. I dati rappresentano la media  $\pm$  SEM di due esperimenti condotti su due controlli e un carrier.

Formattato: Italiano (Italia)

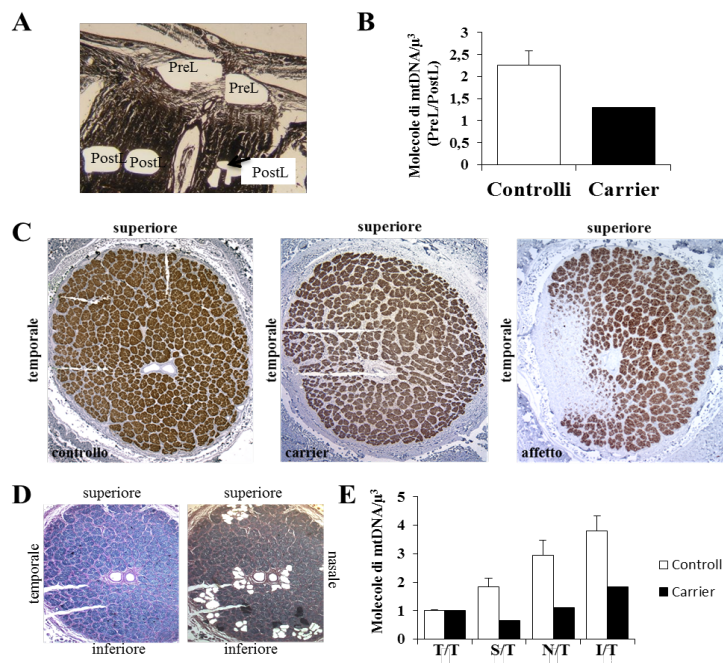
Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Grassetto, Non Corsivo

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt

Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Italiano (Italia)

**Figura 8**



**Figura 8: Il pattern di degenerazione nel nervo ottico segue il gradiente di distribuzione di mtDNA negli assoni**

Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Grassetto, Non Corsivo

**Valutazione del numero di copie di mtDNA in campioni di nervo ottico.**

(A) Sezione sagittale rappresentativa della testa del nervo ottico dopo microdissezione dell'area pre-laminare (PreL) e post-laminare (PostL) (ematossilina eosina, scale bar = 200 mm).

Formattato: Italiano (Italia)

(B) Il contenuto di mtDNA, indicato come molecole di mtDNA per  $\mu\text{m}^3$ , è espresso come rapporto tra l'area pre-laminare e post-laminare. I dati rappresentano la media  $\pm$  SEM di tre esperimenti condotti su sei controlli e un carrier.

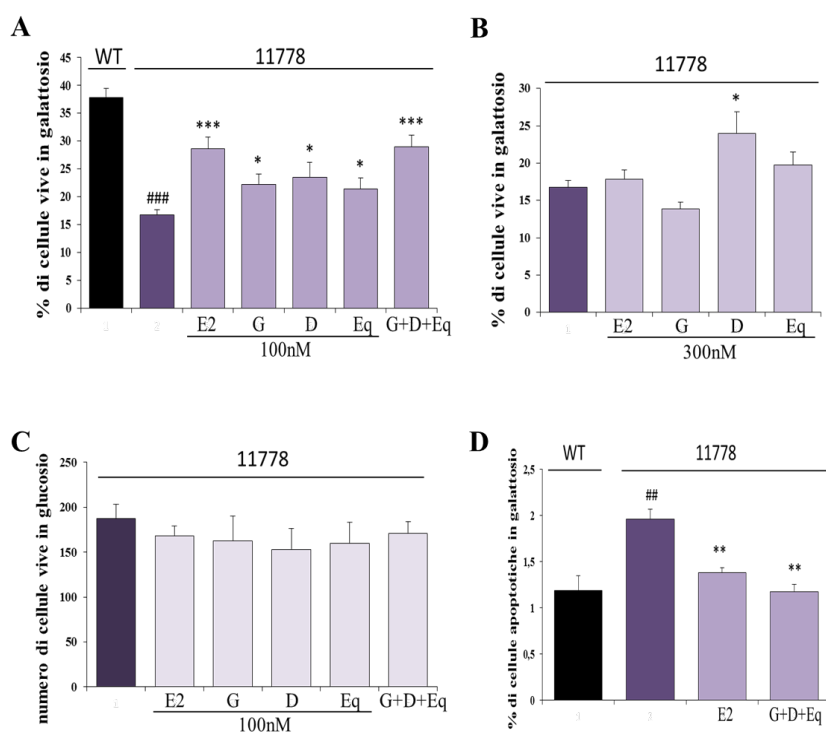
Formattato: Italiano (Italia)

(C) Sezioni della regione post-laminare del nervo ottico di un controllo, un carrier e un affetto (anti-neurofilamento, scale bar = 500 mm). Le immagini mostrano un'estensiva gliosi e un processo neurodegenerativo nella porzione temporale del soggetto affetto.

(D) Immagini rappresentative della porzione post-laminare del nervo ottico prima e dopo la microdissezione con laser della regione temporale (T), inferiore (I), nasale (N) e superiore (S) (Luxol Fast Blue, scale bar = 500 mm).

(E) Il contenuto di mtDNA, indicato come molecole di mtDNA per  $\mu^3$ , è espresso come rapporto tra le diverse regioni (T, S, N, I) e la regione temporale. I dati rappresentano la media  $\pm$  SEM di tre esperimenti condotti su sei controlli e un carrier

**Figura 9**



**Figura 9: I fitoestrogeni migliorano la vitalità cellulare nei ibridi LHON riducendo l'apoptosi.**

(A-B) I ibridi sono stati incubati in glucosio o galattosio e trattati con E2, G, D, Eq, G+D+Eq per 48 ore. Il numero di cellule vive in galattosio è normalizzato per il numero di cellule vive in glucosio allo stesso tempo.

(C) I ibridi sono stati mantenuti in glucosio +/- E2, G, D, Eq, G+D+Eq per 48

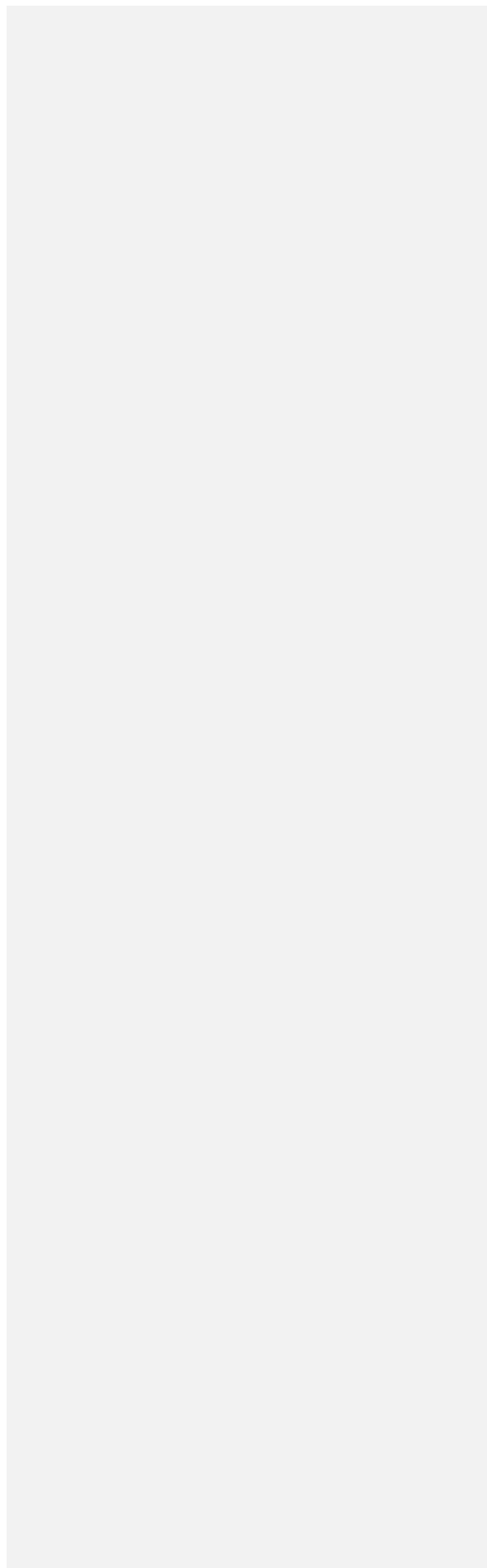
(D) Percentuale di apoptosi nei ibridi incubati in glucosio o galattosio +/- E2, G+D+Eq per 24ore. Il valore delle cellule in apoptosi è espresso come rapporto galattosio/glucosio.

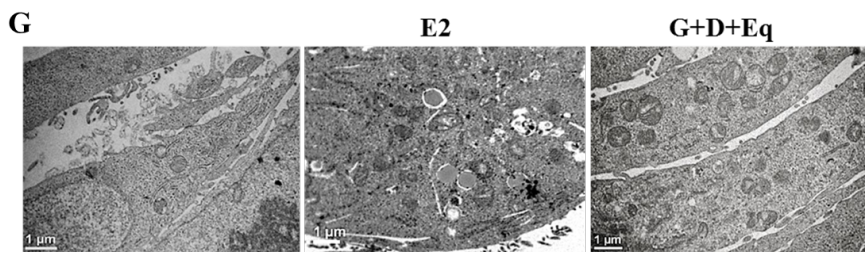
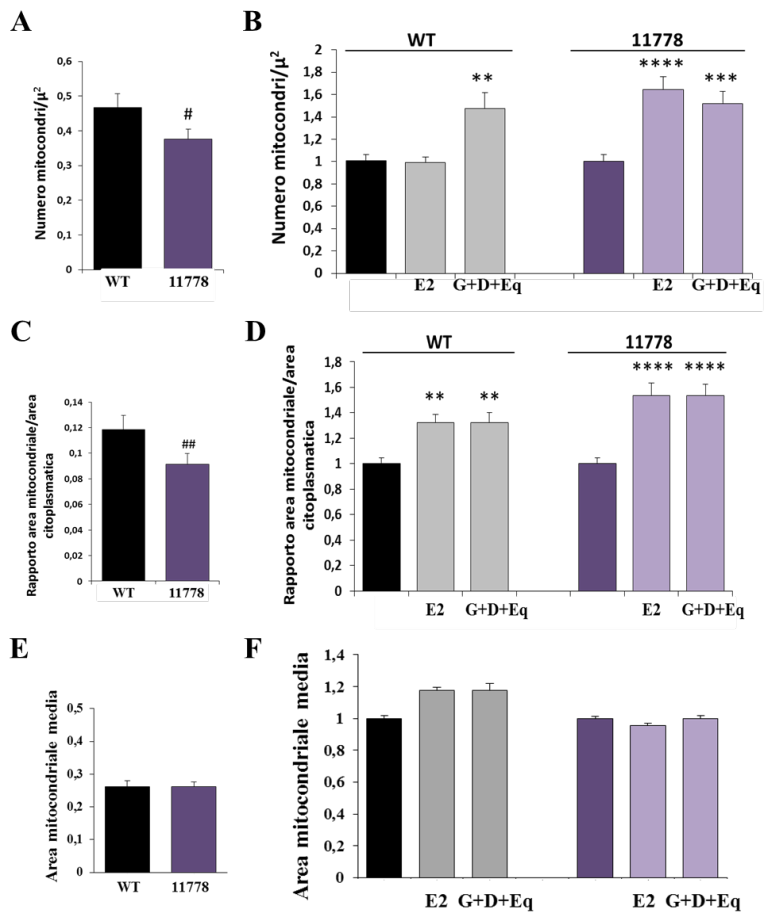
I dati rappresentano la media  $\pm$  SEM di tre esperimenti su 2 linee di controllo e due linee patologiche.

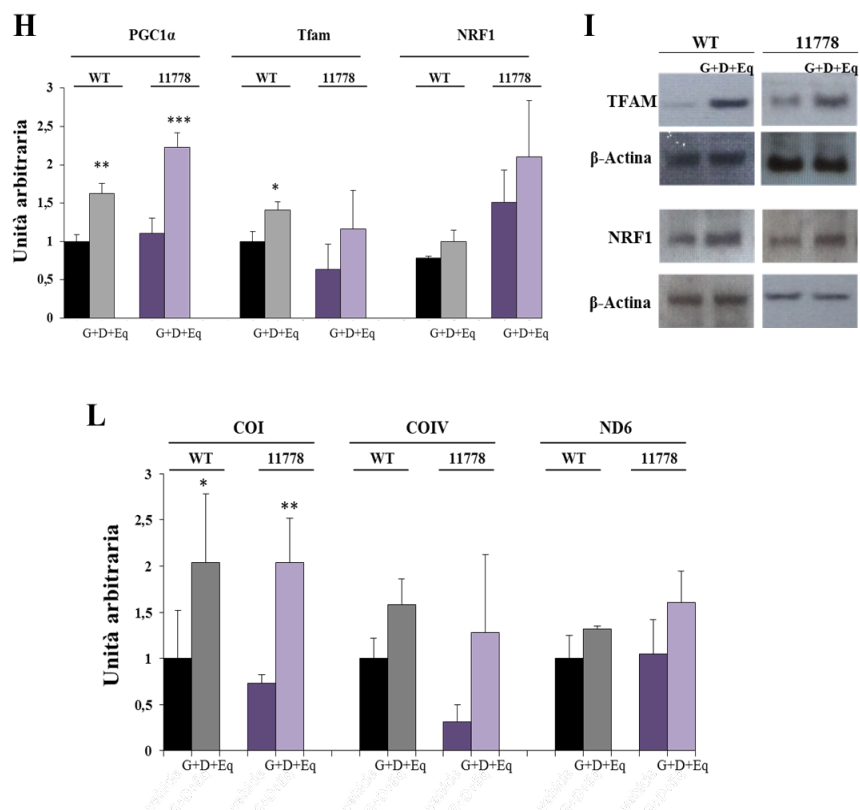
##  $p < 0.01$ ; ###  $p < 0.001$  per 11778 non trattate vs WT non trattate. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  per 11778 trattate vs 11778 non trattate (Anova).

Formattato: Italiano (Italia)

**Figura 10**







**Figura 10: La combinazione di fitoestrogeni induce la biogenesi mitocondriale.**

(A,B,C,D,E,F,G) I ibridi di controllo e patologici sono stati incubati per 24 ore in glucosio +/- G+D+Eq e successivamente processati per l'analisi ultrastrutturale. I dati sono rappresentati come rapporto tra il numero di mitocondri e l'area fotografata ( $\mu^2$ ) (A,B), come rapporto tra l'area mitocondriale e l'area citoplasmatica (C,D) e come area media dei mitocondri (E,F).

(G) Sono mostrate immagini rappresentative di cellule non trattate, trattate con E2 e con G+D+Eq.

(H,I,L) I ibridi di controllo e patologici sono stati incubati in glucosio +/- G+D+Eq e dopo 24 ore è stata valutata l'espressione genica e proteica dei principali regolatori della biogenesi (H,I) e dei geni codificanti per la catena respiratoria mitocondriale (L).

I dati rappresentano la media  $\pm$  SEM di due esperimenti di due ibridi di controllo e due ibridi patologici.

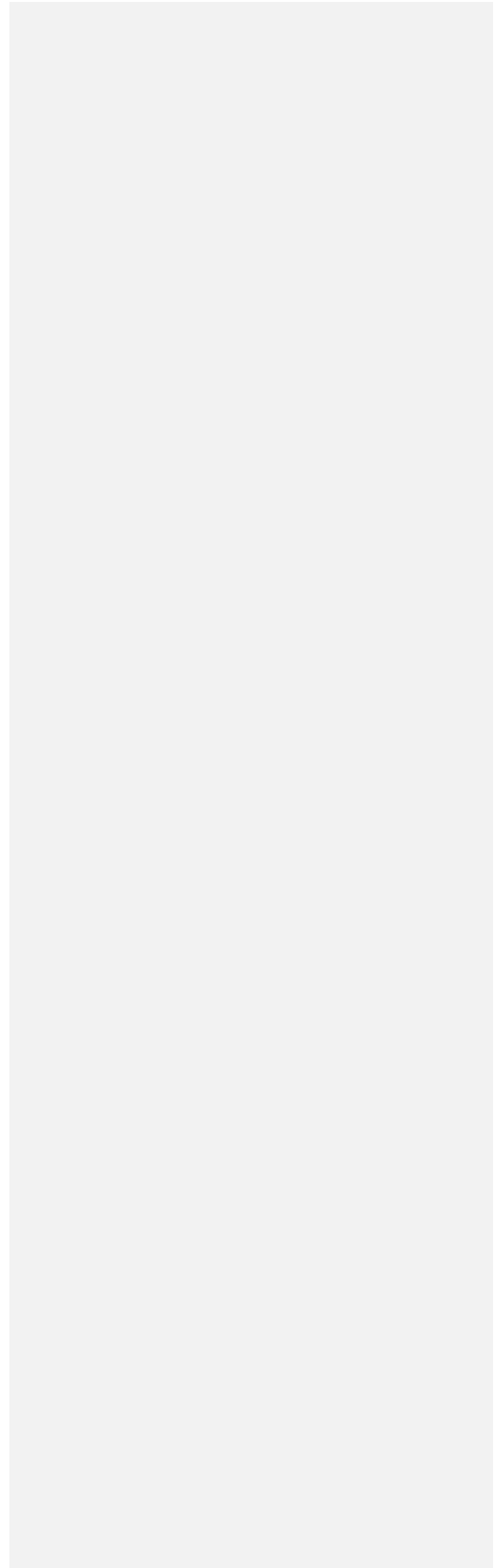
#  $p < 0.05$ ; ##  $p < 0.01$  per 11778 non trattate vs WT non trattate. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  per ibridi trattati vs ibridi non trattati (t-test).

Formattato: Italiano (Italia)

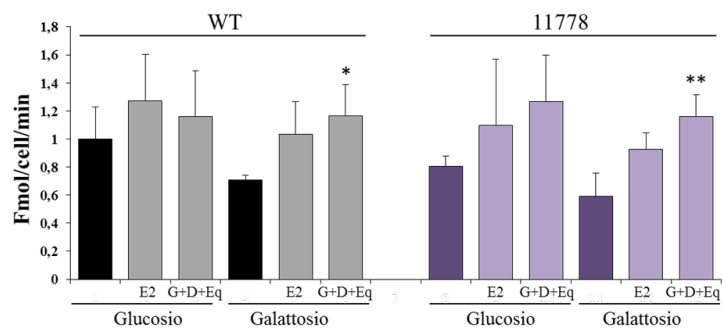
Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Italiano (Italia)

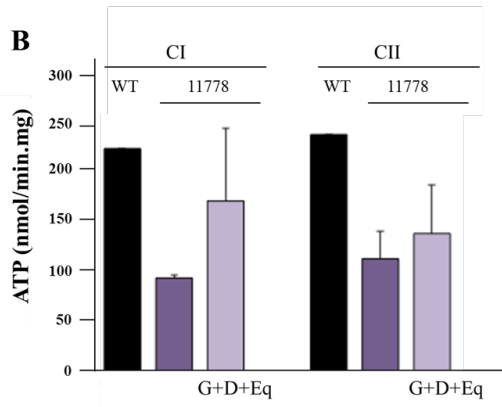
**Figura 11**



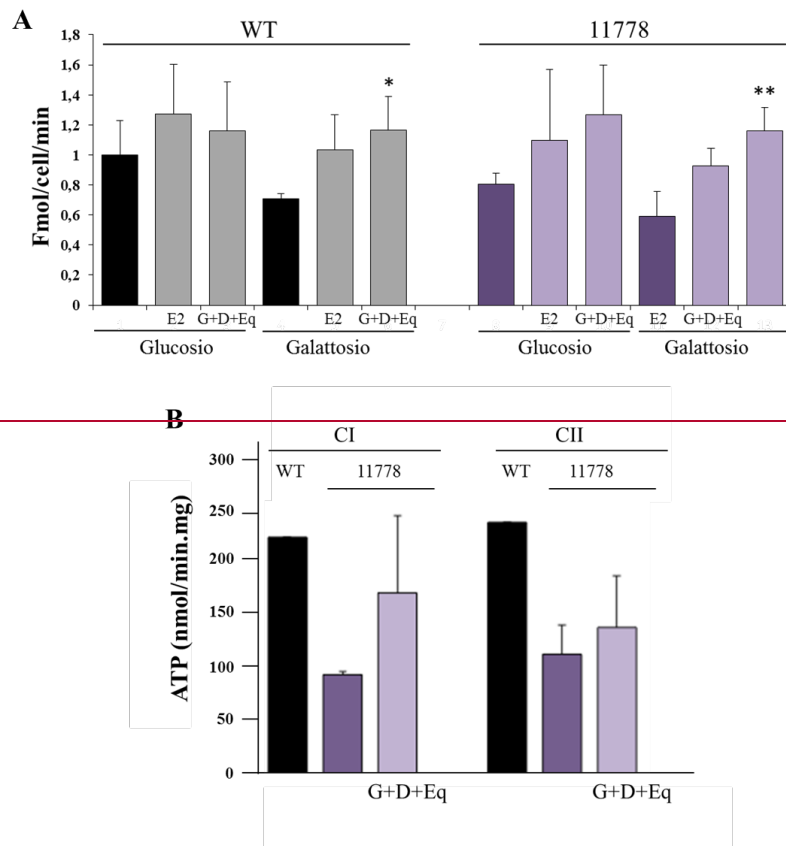
**A**



**B**







**Figura 11: La combinazione di fitoestrogeni migliora le competenze energetiche nei cibridi LHON:**

(A) I cibridi di controllo e patologici sono stati incubati in glucosio o galattosio +/- E2 o G+D+Eq e dopo 24 ore è stato valutato il consumo di ossigeno nelle cellule intatte.

I dati rappresentano la media  $\pm$  SEM di due esperimenti di due linee di controllo e due linee patologiche. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  per 11778 trattate vs 11778 non trattate (Anova).

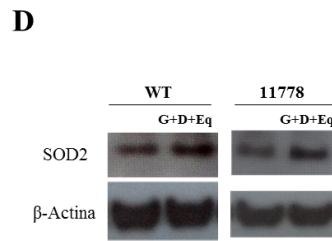
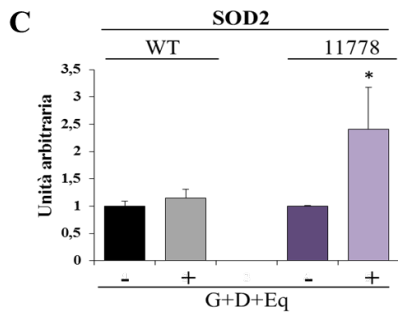
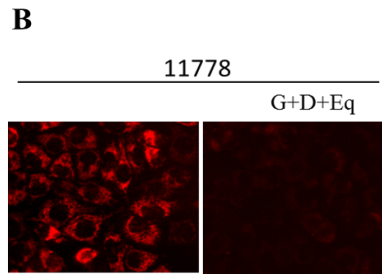
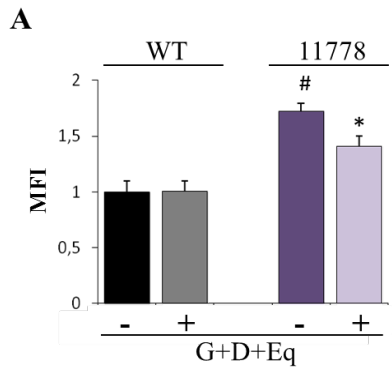
(B) La sintesi di ATP è stata valutata dopo 24 ore di incubazione in glucosio o galattosio +/- G+D+Eq ed è espressa come rapporto galattosio/glucosio. I dati rappresentano la media  $\pm$  SEM di due esperimenti di una linea di controllo e una linea patologica.

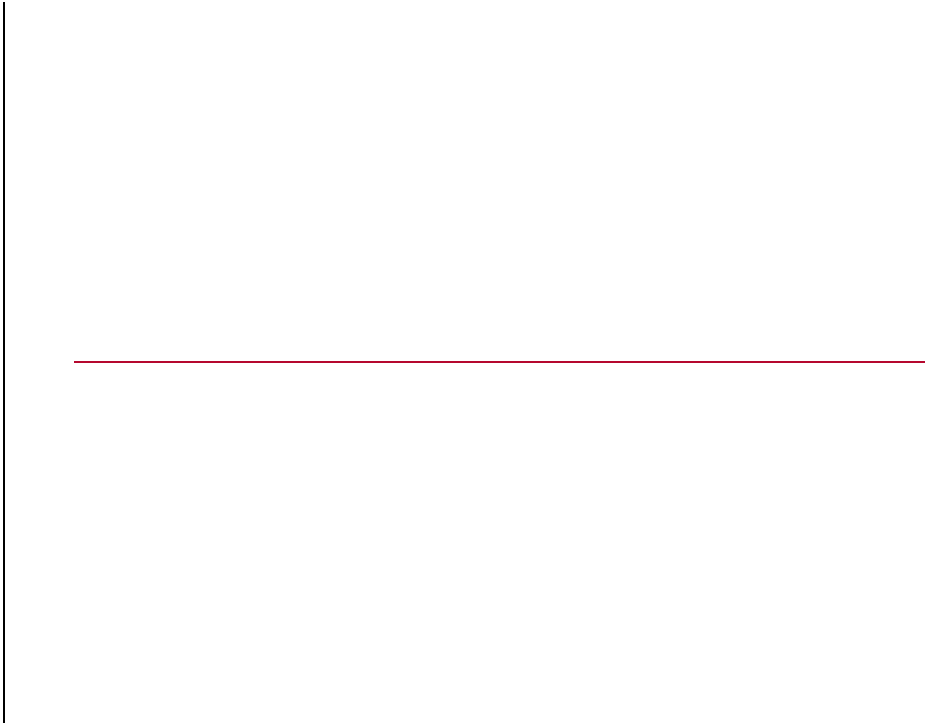
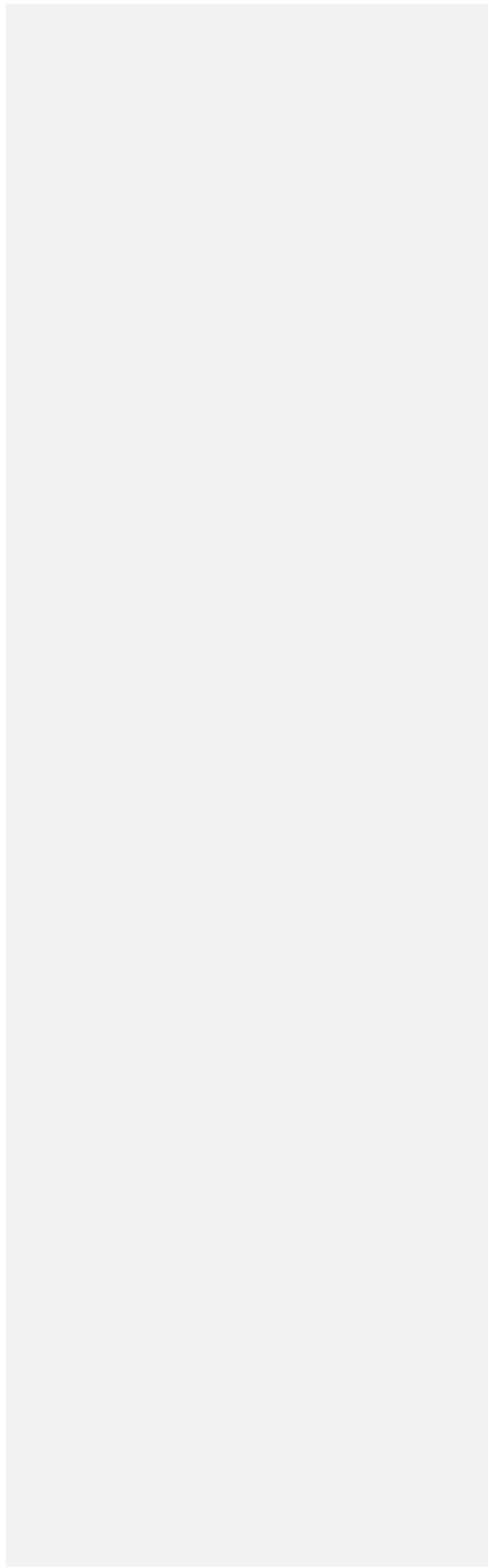
Formattato: Italiano (Italia)

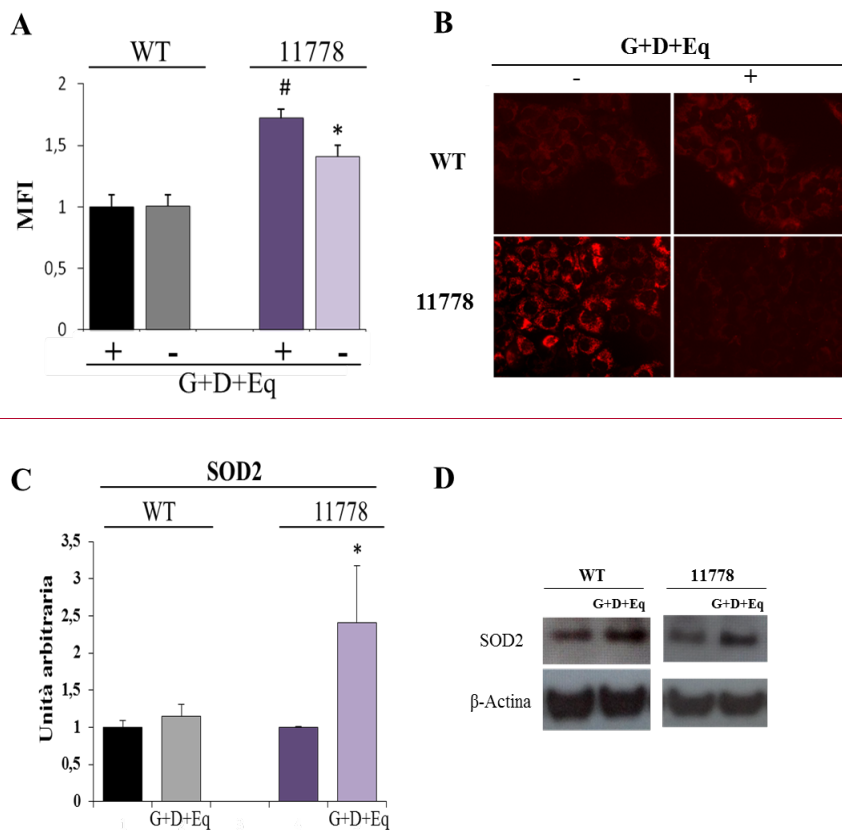
Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Italiano (Italia)

**Figura 12**







**Figura 12: I fitoestrogeni riducono i livelli di superossido mitocondriale ROS e aumentano i livelli di SOD2.**

(A,B) I cibridi di controllo e patologici sono stati incubati per 1 ora in glucosio +/- G+D+Eq e successivamente processati per gli studi di citofluorimetria ed espressi come MFI (Mean Fluorescence Intensity) (A) e per gli studi di immunofluorescenza (B) mediante l'uso dell'indicatore di superossido mitocondriale, MitoSox Red.

(C,D) I cibridi di controllo e patologici sono stati incubati per 24 ore in glucosio +/- G+D+Eq e successivamente effettuata l'analisi genica (C) e proteica (D) della SOD2.

I dati rappresentano la media  $\pm$  SEM di due esperimenti di due cibridi di controllo e due cibridi patologici.

#  $p < 0.05$  per 11778 non trattate vs WT non trattate. \* $p < 0.05$  per cibridi trattati vs cibridi non trattati (t-test).

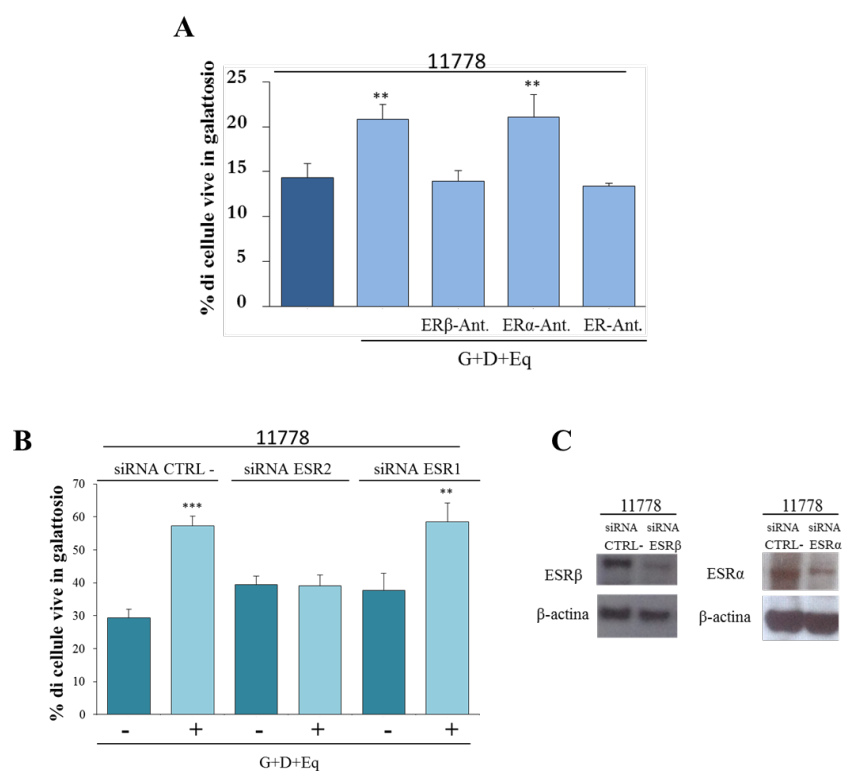
Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Italiano (Italia)

**Figura 13**



**Figura 13: L'azione dei fitoestrogeni è mediata da ERα**

(A) I ibridi sono stati incubati in glucosio e galattosio +/- G+D+Eq, ICI (ER-Ant), PHTPP (ERβ-Ant), MPP (ERα-Ant) per 48 ore. Il numero di cellule vive in galattosio è normalizzato per il numero di cellule vive in glucosio allo stesso tempo. I dati rappresentano la media ± SEM di tre esperimenti. \*\*p< 0.01 per 11778 trattate vs 11778 non trattate (Anova).

(B) I ibridi sono stati silenziati con un siRNA vuoto (siRNA CTRL-), un siRNA per ERβ (siRNA ESR2), un siRNA per ERα (siRNA ESR1) e dopo 24 ore incubati in glucosio e galattosio +/- G+D+Eq per 24 ore. Il numero di cellule vive in galattosio è normalizzato per il numero di cellule vive in glucosio allo stesso tempo. I dati rappresentano la media ± SEM di tre esperimenti. \*\*p< 0.01, \*\*\*p< 0.001 per 11778 trattate vs 11778 non trattate (T-test).

Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Italiano (Italia)

(C) I ibridi sono stati silenziati con un siRNA vuoto (siRNA CTRL-), un siRNA per ER $\beta$  (siRNA ESR2), un siRNA per ER $\alpha$  (siRNA ESR1) e dopo 24 ore è stata valutata l'efficienza del silenziamento mediante Western Blot.

Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Italiano (Italia)

## 5. DISCUSSIONE

La neuropatia ottica ereditaria di Leber è la più frequente delle patologie mitocondriali. Gli aspetti caratteristici della LHON comprendono la rapida perdita della visione centrale che colpisce prevalentemente i maschi in giovane età e porta ad atrofia ottica ad un anno dall'esordio. La disfunzione mitocondriale è associata con specifiche mutazioni nel mtDNA a carico di geni che codificano per alcune subunità del complesso I della catena respiratoria mitocondriale (ND1, ND4 e ND6). Nonostante siano stati fatti notevoli progressi nella comprensione della LHON, ad oggi non è stata identificata nessuna terapia efficace e restano ancora da chiarire due fenomeni importanti caratteristici della malattia: la prevalenza nei maschi rispetto alle femmine e la sua variabile penetranza (solo una sottopopolazione dei soggetti portatori della mutazione sviluppa la malattia).

Una strategia compensatoria della disfunzione mitocondriale, comunemente osservata nelle malattie mitocondriali, è l'aumento della biogenesi mitocondriale (esemplificata dalla massiva proliferazione mitocondriale). Quindi entro certi limiti, un aumento della massa mitocondriale può essere una strategia compensatoria di successo. Inoltre diversi lavori hanno sottolineato, in un numero esiguo di campioni, un aumento del contenuto di mtDNA nel sangue di pazienti LHON (Iommarini et al, 2012; Yen et al, 2002) e nel sangue dei portatori delle mutazioni non affetti (Nishioka et al, 2004) rispetto ai controlli, suggerendo l'attivazione della biogenesi mitocondriale. Alla luce di ciò abbiamo analizzato il contenuto di mtDNA in pazienti affetti, carrier e soggetti di controllo, in collaborazione con il Prof. Carelli dell'Università di Bologna, il Prof. Sadun dell'Università di Los Angeles e il Prof.

Cantatore dell'Università di Bari. Lo studio ha riguardato l'analisi di differenti tessuti, in particolare nel nostro laboratorio abbiamo effettuato l'analisi dell' mtDNA di mtDNA in campioni ematici e in campioni oculari. Per prima cosa abbiamo valutato il numero di copie dell' mtDNA di mtDNA nei globuli bianchi periferici provenienti da pazienti malati, carrier e soggetti di controllo appartenenti a tre grandi famiglie affette dalla LHON (portatrici della mutazione m.11778G>A) evidenziando differenze significative tra i tre gruppi. Infatti sia i soggetti affetti che i carrier presentano un aumento significativo del numero di copie dell' mtDNA di mtDNA rispetto ai soggetti di controllo, anche se i carrier rappresentano il gruppo con il contenuto di mtDNA maggiore. Gli stessi risultati si evincono dallo studio di 64 affetti e 68 carrier provenienti da 39 famiglie italiane portatrici delle tre mutazioni più comuni nella LHON: m.11778G>A, m.3460G>A e m.14484T>C. Anche in questo caso, infatti, i carrier hanno un numero di copie di mtDNA maggiore rispetto ai soggetti affetti. Successivamente, per confermare l'attivazione della biogenesi mitocondriale nei globuli bianchi periferici, abbiamo studiato un numero limitato di campioni (9 controlli, 8 affetti, 9 carrier) valutando sia la quantità di mtDNA che l'espressione genica di regolatori chiave della biogenesi mitocondriale (PPRC1, NRF1 e TFAM). Oltre a confermare l'aumento del numero di copie dell' mtDNA di mtDNA nei carrier, abbiamo evidenziato un incremento dell'espressione genica di questi regolatori nei portatori delle mutazioni (affetti e carrier non affetti); in modo particolare l'aumento è significativo nei carrier. L'insieme di questi dati suggerisce un'attivazione della biogenesi mitocondriale nei globuli bianchi periferici dei carrier. Parallelamente abbiamo esteso l'analisi dell' mtDNA di mtDNA ai tessuti oculari, principalmente coinvolti nella malattia, effettuando un'analisi morfologica e molecolare di campioni autoptici di nervo ottico e di retina provenienti da soggetti affetti, carrier e soggetti di controllo. Nei soggetti di

controllo abbiamo evidenziato un aumento del contenuto di mtDNA nella regione maculare della retina, rispetto alla regione nasale. Questi dati suggeriscono che le cellule ganglionari retiniche della macula, che danno origine agli assoni che entrano nella porzione temporale del nervo ottico, punto di inizio della neurodegenerazione nella LHON, sono le cellule con il maggior fabbisogno energetico. Abbiamo osservato, inoltre, che il carrier mostra un rapporto tra il contenuto di mtDNA della macula e quello della regione nasale maggiore rispetto ai controlli, suggerendo una possibile compensazione nelle RGC della macula.

Inoltre abbiamo valutato il numero di copie ~~dell' mtDNA~~ di mtDNA nelle regioni del nervo ottico, dimostrando che la regione temporale presenta la minore densità di mtDNA, mentre la porzione nasale ed inferiore risultano avere la densità maggiore. Questi dati riflettono il processo neurodegenerativo nella LHON che inizia nella regione temporale del nervo ottico, continua nella regione centrale, risparmiando le regioni superiori, nasali ed inferiori. Inoltre, nel carrier, sembra esserci un aumento compensatorio della densità ~~dell' mtDNA~~ di mtDNA nel settore temporale rispetto agli altri settori dello stesso nervo. I dati ottenuti dall'analisi del contenuto ~~dell' mtDNA~~ di mtDNA nel nervo ottico e nella retina evidenziano che, nell'unico carrier studiato, si verifica un aumento compensatorio della quantità di mtDNA nelle RGC maculari e nei loro assoni.

Questi dati, evidenziano una correlazione tra la penetranza incompleta nella LHON e l'efficienza della biogenesi mitocondriale. Provano, infatti, che il contenuto di mtDNA può differenziare gli individui affetti da i portari sani non affetti, che la biogenesi mitocondriale può essere un fattore importante nella progressione della malattia e avvalorano l'ipotesi che gli individui portatori abbiano maggiori probabilità di raggiungere, una biogenesi mitocondriale altamente efficiente (Giordano C et al, 2014). La capacità di indurre in

Formattato: Italiano (Italia)



maniera più efficace la biogenesi mitocondriale può dipendere da fattori genetici, ambientali (Carelli et al, 2004; Sadun et al, 2003), ormonali (Giordano C et al, 2011) o dall'insieme di questi.

Nel nostro laboratorio abbiamo, recentemente dimostrato, che il 17 $\beta$ -estradiolo migliora la disfunzione mitocondriale nelle cellule LHON, inducendo la biogenesi mitocondriale con conseguente miglioramento delle competenze energetiche. Questo effetto è mediato dai recettori per gli estrogeni (ER) e, cosa importante, abbiamo dimostrato che le cellule ganglionari della retina esprimono i recettori estrogenici  $\beta$  (ER $\beta$ ) (Giordano C et al, 2011); tali risultati evidenziano come la bassa prevalenza nel sesso femminile potrebbe essere secondaria ad un effetto protettivo degli estrogeni. Queste osservazioni aprono possibili sviluppi terapeutici, l'attivazione selettiva di ER $\beta$  è interessante perché evita la modulazione sessuale e la risposta proliferativa mediata da ER $\alpha$  che sono correlate con un elevato rischio di cancro.

Al fine di valutare gli effetti dell'attivazione selettiva del recettore estrogenico beta abbiamo testato, nel modello dei ibridi trasmitocondriali, l'azione di tre fitoestrogeni naturali: genisteina (G), daidzeina (D) ed equolo (Eq); somministrati singolarmente o in combinazione. Questo perché in letteratura è noto che l'utilizzo di una combinazione di fitoestrogeni ha una maggiore selettività e una migliore efficacia per ER $\beta$  (Zhao L et al, 2009). L'effetto è stato valutato in una condizione normale, la crescita in glucosio, ed in una condizione stressante, la crescita in galattosio. In presenza di galattosio, infatti, le cellule sono costrette ad utilizzare la fosforilazione ossidativa come fonte di ATP fenomeno che porta ad una riduzione della vitalità cellulare, predispone all'apoptosi (Ghelli et al, 2003; Zanna et al, 2005), ed aumenta lo stress ossidativo (Floreani et al, 2005).

Formattato: Italiano (Italia)

Usando questo paradigma metabolico abbiamo investigato gli effetti della combinazione specifica dei tre fitoestrogeni su ibridi LHON (portatori della mutazione primaria 11778/ND4) e su ibridi di controllo. L'esposizione delle cellule a 100nM di genisteina, daidzeina ed equolo porta ad un aumento significativo della vitalità nei ibridi patologici in galattosio; questo aumento diventa però maggiormente significativo solo quando le tre molecole sono combinate insieme, confermando che la combinazione specifica dei tre fitoestrogeni ha un effetto maggiore rispetto all'effetto delle singole molecole (Zhao L et al, 2009). E' da notare che l'efficacia di G+D+Eq ~~ella mix~~ è paragonabile a quella del 17β-estradiolo e che la combinazione dei fitoestrogeni ~~mix~~ porta anche ad un significativa riduzione della morte cellulare per apoptosi nei ibridi LHON. Gli effetti benefici sulla vitalità cellulare sono correlati con l'attivazione della biogenesi mitocondriale. Da un'analisi ultrastrutturale abbiamo dimostrato che la combinazione specifica dei fitoestrogeni porta ad un aumento significativo del numero dei mitocondri e dell'area occupata all'interno delle cellule ma non dell'area media mitocondriale. Parallelamente si osserva anche l'attivazione del coattivatore della trascrizione PGC1α e dei fattori di trascrizione NRF1 e ~~mt~~TFAM cruciali nella replicazione, trascrizione e nel mantenimento del mtDNA, e l'aumento dei geni codificanti per la catena respiratoria mitocondriale MTCOI, MTND6 e COIV. Inoltre il trattamento migliora le competenze energetiche delle cellule. La ~~mix~~ combinazione dei fitoestrogeni induce un aumento del consumo di ossigeno, in entrambe le condizioni di crescita, sia nei ibridi patologici che in quelli di controllo e porta anche un lieve aumento della sintesi di ATP. Abbiamo dimostrato anche il ruolo ~~della mix~~ di G+D+Eq nello stress ossidativo: ~~G+D+Eq~~ riducono i livelli delle specie reattive dell'ossigeno nei ibridi mantenuti in glucosio ed aumentano l'espressione genica e proteica della SOD2, principale enzima antiossidante mitocondriale. Il passo

Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Italiano (Italia)

successivo è stato quello di verificare se l'azione dei fitoestrogeni fosse mediata da ER $\beta$ . A questo scopo abbiamo bloccato sia alternativamente che contemporaneamente le isoforme  $\alpha$  e  $\beta$  con specifici antagonisti selettivi e successivamente abbiamo valutato l'effetto della combinazione dei fitoestrogeni sulla vitalità cellulare in galattosio. Il blocco di ER $\beta$ , così come il blocco di entrambi i recettori, annulla gli effetti benefici della mix-combinazione dei fitoestrogeni sulla vitalità, annullamento che non si osserva in seguito al blocco farmacologico di ER $\alpha$ . La stessa situazione è stata riscontrata in seguito al silenziamento delle due isoforme di ER. Il trattamento con fitoestrogeni su cellule precedentemente silenziate per l'isoforma  $\beta$  non comporta nessun aumento di vitalità su ibridi mutati. Quando invece le cellule vengono trattate dopo il silenziamento di ER $\alpha$ , il trattamento con fitoestrogeni induce un aumento significativo della vitalità, in accordo con l'ipotesi che l'effetto sia mediato da ER $\beta$ .

Nel complesso i nostri dati suggeriscono che la combinazione specifica di G+D+Eq migliora la biogenesi mitocondriale, riduce lo stress ossidativo delle cellule LHON e quindi la morte per apoptosi e apoptosi e che -q. Questi effetti sono mediati da ER $\beta$ .

Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Italiano (Italia)

## 6. CONCLUSIONE

### Conclusioni

I nostri risultati confermano che le mutazioni mitocondriali nel complesso I sono necessarie ma non sufficienti allo sviluppo della malattia e che i pazienti affetti mostrano una minore capacità rispetto ai portatori non affetti di attivare la biogenesi mitocondriale. Restano da capire i meccanismi alla base di questa differenza. Lo studio approfondito dei meccanismi che regolano la biogenesi mitocondriale è mandatorio al fine

Formattato: Struttura + Livello:1 + Stile numerazione: 1, 2, 3, ... + Comincia da:1 + Allineamento: A sinistra + Allinea a: 0,63 cm + Imposta un rientro di: 1,27 cm

Formattato: Tipo di carattere: Calibri

Formattato: Normale, Allineato a sinistra, Nessun elenco puntato o numerato

Formattato: Italiano (Italia)

di comprendere a pieno la patofisiologia della LHON. Nel nostro studio dimostriamo che l'attivazione del recettore  $\beta$  degli estrogeni è uno dei fattori coinvolti in questo processo. Questo risultato da una parte spiega la ridotta prevalenza della malattia nel sesso femminile e dall'altra apre importanti prospettive terapeutiche.

Formattato: Italiano (Italia)

## 7. BIBLIOGRAFIA

Formattato: Struttura + Livello:1 + Stile numerazione: 1, 2, 3, ... + Comincia da:1 + Allineamento: A sinistra + Allinea a: 0,63 cm + Imposta un rientro di: 1,27 cm

- ✓ Andrews RM1, Griffiths PG, Johnson MA, Turnbull DM. Histochemical localisation of mitochondrial enzyme activity in human optic nerve and retina. Br J Ophthalmol. 1999 Feb;83(2):231-5.
- ✓ Barron MJ1, Griffiths P, Turnbull DM, Bates D, Nichols P. The distributions of mitochondria and sodium channels reflect the specific energy requirements and conduction properties of the human optic nerve head. Br J Ophthalmol. 2004 Feb;88(2):286-90.
- ✓ Borrás C, Gambini J, Gómez-Cabrera MC, Sastre J, Pallardó FV, Mann GE, Viña J. Genistein, a soy isoflavone, up-regulates expression of antioxidant genes: involvement of estrogen receptors, ERK1/2, and NFkappaB. FASEB J. 2006 Oct;20(12):2136-8. Epub 2006 Sep 11.
- ✓ Carelli V, La Morgia C, Valentino ML, Rizzo G, Carbonelli M, De Negri AM, Sadun F, Carta A, Guerriero S, Simonelli F, Sadun AA, Aggarwal D, Liguori R, Avoni P, Baruzzi A, Zeviani M, Montagna P, Barboni P. Idebenone treatment in Leber's hereditary optic neuropathy. Brain. 2011 Sep;134(Pt 9):e188. doi: 10.1093/brain/awr180. Epub 2011 Aug 2.

Formattato: Italiano (Italia)

- ✓ Carelli V1, Achilli A, Valentino ML, Rengo C, Semino O, Pala M, Olivieri A, Mattiazzi M, Pallotti F, Carrara F, Zeviani M, Leuzzi V, Carducci C, Valle G, Simionati B, Mendieta L, Salomao S, Belfort R Jr, Sadun AA, Torroni A. Haplogroup effects and recombination of mitochondrial DNA: novel clues from the analysis of Leber hereditary optic neuropathy pedigrees. *Am J Hum Genet.* 2006 Apr;78(4):564-74. Epub 2006 Jan 27.
- ✓ Carelli V, Ross-Cisneros FN, Sadun AA. Mitochondrial dysfunction as a cause of optic neuropathies. *Prog Retin Eye Res.* 2004 Jan;23(1):53-89.
- ✓ Chinnery PF, Hudson G. Mitochondrial genetics. *Br Med Bull.* 2013;106:135-59. doi: 10.1093/bmb/ldt017. Epub 2013 May 22.
- ✓ Clayton DA. Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell.* 1982 Apr;28(4):693-705.
- ✓ Copeland WC. Defects in mitochondrial DNA replication and human disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2012 Jan-Feb;47(1):64-74. doi: 10.3109/10409238.2011.632763.
- ✓ Cossarizza A, Riva A, Pinti M, Ammannato S, Fedeli P, Mussini C, Esposito R, Galli M. Increased mitochondrial DNA content in peripheral blood lymphocytes from HIV-infected patients with lipodystrophy. *Antivir Ther.* 2003 Aug;8(4):315-21.
- ✓ Davis RL, Sue CM. The genetics of mitochondrial disease. *Semin Neurol.* 2011 Nov;31(5):519-30. doi: 10.1055/s-0031-1299790. Epub 2012 Jan 21.
- ✓ Dixon RA. Phytoestrogens. *Annu Rev Plant Biol.* 2004;55:225-61.
- ✓ Floreani M, Napoli E, Martinuzzi A, Pantano G, De Riva V, Trevisan R, et al. Antioxidant defences in cybrids harboring mtDNA mutations associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *FEBS J.* 2005; 272: 1124–35.
- ✓ Fraser JA, Biousse V, Newman NJ. The neuro-ophthalmology of mitochondrial disease. *Surv Ophthalmol.* 2010 Jul-Aug;55(4):299-334. doi:10.1016/j.survophthal.2009.10.002. Epub 2010 May 14.
- ✓ Ghelli A, Zanna C, Porcelli AM, Schapira AH, Martinuzzi A, Carelli V, et al. Leber's hereditary optic neuropathy (LHON) pathogenic mutations induce mitochondrial dependent apoptotic death in transmitochondrial cells incubated with galactose medium. *J Biol Chem.* 2003; 278: 4145–50.
- ✓ Giles RE, Blanc H, Cann HM, Wallace DC. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980 Nov;77(11):6715-9.
- ✓ Giordano C, Iommarini L, Giordano L, Maresca A, Pisano A, Valentino ML, Caporali L, Liguori R, Deceglie S, Roberti M, Fanelli F, Fracasso F, Ross-Cisneros FN, D'Adamo P, Hudson G, Pyle A, Yu-Wai-Man P, Chinnery PF, Zeviani M, Salomao SR, Berezovsky A, Belfort R Jr, Ventura DF, Moraes M, Moraes Filho M, Barboni P, Sadun F, De Negri A,

Formattato: Puntato + Livello:1 + Allinea a: 0,63 cm + Imposta un rientro di: 1,27 cm

Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Italiano (Italia)

- Sadun AA, Tancredi A, Mancini M, d'Amati G, Loguercio Polosa P, Cantatore P, Carelli V. Efficient mitochondrial **biogenesisbiogenesi** drives incomplete penetrance in Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain*. 2014 Feb;137(Pt 2):335-53. doi: 10.1093/brain/awt343. Epub 2013 Dec 24.
- ✓ Giordano C, d'Amati G. Evaluation of gastrointestinal mtDNA depletion in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). *Methods Mol Biol*. 2011;755:223-32. doi: 10.1007/978-1-61779-163-5\_18.
  - ✓ Giordano C, Montopoli M, Perli E, Orlandi M, Fantin M, Ross-Cisneros FN, Caparrotta L, Martinuzzi A, Ragazzi E, Ghelli A, Sadun AA, d'Amati G, Carelli V. Oestrogens ameliorate mitochondrial dysfunction in Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain*. 2011 Jan;134(Pt 1):220-34. doi: 10.1093/brain/awq276. Epub 2010 Oct 13.
  - ✓ Goetzl MA, Van Veldhuizen PJ, Thrasher JB. Effects of soy phytoestrogens on the prostate. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2007;10(3):216-23. Epub 2007 Feb 20.
  - ✓ Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science*. 1998 Aug 28;281(5381):1309-12.
  - ✓ Gustafsson JA. Estrogen receptor beta--a new dimension in estrogen mechanism of action. *J Endocrinol*. 1999 Dec;163(3):379-83.
  - ✓ Hsieh HM, Wu WM, Hu ML. Genistein attenuates D-galactose-induced oxidative damage through decreased reactive oxygen species and NF-κB binding activity in neuronal PC12 cells. *Life Sci*. 2011 Jan 3;88(1-2):82-8. doi: 10.1016/j.lfs.2010.10.021. Epub 2010 Nov 5.
  - ✓ Huang CC, Kuo HC, Chu CC, Kao LY. Rapid visual recovery after coenzyme q10 treatment of leber hereditary optic neuropathy. *J Neuroophthalmol*. 2002 Mar;22(1):66.
  - ✓ Hudson G, Carelli V, Spruijt L, Gerards M, Mowbray C, Achilli A, Pyle A, Elson J, Howell N, La Morgia C, Valentino ML, Huoponen K, Savontaus ML, Nikoskelainen E, Sadun AA, Salomao SR, Belfort R Jr, Griffiths P, Man PY, de Coe RF, Horvath R, Zeviani M, Smeets HJ, Torroni A, Chinnery PF. Clinical expression of Leber hereditary optic neuropathy is affected by the mitochondrial DNA-haplogroup background. *Am J Hum Genet*. 2007 Aug;81(2):228-33. Epub 2007 Jun 4.
  - ✓ Jommarini L, Maresca A, Caporali L, Valentino ML, Liguori R, Giordano C, Carelli V. Revisiting the issue of mitochondrial DNA content in optic mitochondrial pathies. *Neurology*. 2012 Oct 2;79(14):1517-9. doi: 10.1212/WNL.0b013e31826d5f72. Epub 2012 Sep 19.
  - ✓ King MP, Attardi G. Isolation of human cell lines lacking mitochondrial DNA. *Methods Enzymol*. 1996;264:304-13.

Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Italiano (Italia)

- ✓ Klopstock T, Yu-Wai-Man P, Dimitriadis K, Rouleau J, Heck S, Bailie M, Atawan A, Chattopadhyay S, Schubert M, Garip A, Kernt M, Petraki D, Rummey C, Leinonen M, Metz G, Griffiths PG, Meier T, Chinnery PF. A randomized placebo-controlled trial of idebenone in Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain*. 2011 Sep;134(Pt 9):2677-86. doi: 10.1093/brain/awr170. Epub 2011 Jul 25.
- ✓ Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*. 1998 Oct;139(10):4252-63.
- ✓ La Morgia C, Ross-Cisneros FN, Sadun AA, Hannibal J, Munarini A, Mantovani V, Barboni P, Cantalupo G, Tozer KR, Sancisi E, Salomao SR, Moraes MN, Moraes-Filho MN, Heegaard S, Milea D, Kjer P, Montagna P, Carelli V. Melanopsin retinal ganglion cells are resistant to neurodegeneration in mitochondrial optic neuropathies. *Brain*. 2010 Aug;133(Pt 8):2426-38. doi: 10.1093/brain/awq155. Epub 2010 Jul 21.
- ✓ Lenaz G. Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Aug 10;1366(1-2):53-67.
- ✓ Levin ER, Pietras RJ. Estrogen receptors outside the nucleus in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2008 Apr;108(3):351-61. Epub 2007 Jun 26.
- ✓ Makela S, Davis VL, Tally WC, Korkman J, Salo L, Vihko R, Santti R, Korach KS. Dietary Estrogens Act through Estrogen Receptor-Mediated Processes and Show No Antiestrogenicity in Cultured Breast Cancer Cells. *Environ Health Perspect*. 1994 Jun;102(6-7):572-8.
- ✓ Man PY, Griffiths PG, Brown DT, Howell N, Turnbull DM, Chinnery PF. The epidemiology of Leber hereditary optic neuropathy in the North East of England. *Am J Hum Genet*. 2003 Feb;72(2):333-9. Epub 2002 Jan 7.
- ✓ McCulloch V1, Seidel-Rogol BL, Shadel GS. A human mitochondrial transcription factor is related to RNA adenine methyltransferases and binds S-adenosylmethionine. *Mol Cell Biol*. 2002 Feb;22(4):1116-25.
- ✓ Mokranjac D1, Neupert W. Protein import into mitochondria. *Biochem Soc Trans*. 2005 Nov;33(Pt 5):1019-23.
- ✓ Moreno-Loshuertos R, Acín-Pérez R, Fernández-Silva P, Movilla N, Pérez-Martos A, Rodríguez de Córdoba S, Gallardo ME, Enríquez JA. Differences in reactive oxygen species production explain the phenotypes associated with common mouse mitochondrial DNA variants. *Nat Genet*. 2006 Nov;38(11):1261-8. Epub 2006 Oct 1.
- ✓ Nilsson S, Koehler KF, Gustafsson JÅ. Development of subtype-selective oestrogen receptor-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2011 Sep 16;10(10):778-92. doi: 10.1038/nrd3551.

- ✓ Nishioka T, Soemantri A, Ishida T. mtDNA/nDNA ratio in 14484 LHON mitochondrial mutation carriers. *J Hum Genet.* 2004;49(12):701-5. Epub 2004 Nov 16.
- ✓ Pan BX1, Ross-Cisneros FN, Carelli V, Rue KS, Salomao SR, Moraes-Filho MN, Moraes MN, Berezovsky A, Belfort R Jr, Sadun AA. Mathematically modeling the involvement of axons in Leber's hereditary optic neuropathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012 Nov 9;53(12):7608-17. doi: 10.1167/iovs.12-10452.
- ✓ Perales-Clemente E, Fernández-Silva P, Acín-Pérez R, Pérez-Martos A, Enríquez JA. Allotopic expression of mitochondrial-encoded genes in mammals: achieved goal, undemonstrated mechanism or impossible task? *Nucleic Acids Res.* 2011 Jan;39(1):225-34. doi: 10.1093/nar/gkq769. Epub 2010 Sep 7.
- ✓ Rasbach KA, Schnellmann RG. Isoflavones promote mitochondrial **biogenesisbiogenesis**. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008 May;325(2):536-43. doi: 10.1124/jpet.107.134882. Epub 2008 Feb 11.
- ✓ Sadun AA, Chicani CF, Ross-Cisneros FN, Barboni P, Thoolen M, Shrader WD, Kubis K, Carelli V, Miller G. Effect of EPI-743 on the clinical course of the mitochondrial disease Leber hereditary optic neuropathy. *Arch Neurol.* 2012 Mar;69(3):331-8. doi: 10.1001/archneurol.2011.2972.
- ✓ Sadun AA, La Morgia C, Carelli V. Leber's Hereditary Optic Neuropathy. *Curr Treat Options Neurol.* 2011 Feb;13(1):109-17. doi: 10.1007/s11940-010-0100-y.
- ✓ Sadun AA, Carelli V, Salomao SR, Berezovsky A, Quiros PA, Sadun F, DeNegri AM, Andrade R, Moraes M, Passos A, Kjaer P, Pereira J, Valentino ML, Schein S, Belfort R. Extensive investigation of a large Brazilian pedigree of 11778/haplogroup J Leber hereditary optic neuropathy. *Am J Ophthalmol.* 2003 Aug;136(2):231-8.
- ✓ Sadun AA. Mitochondrial optic neuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2002 Apr;72(4):423-5.
- ✓ Sadun AA, Win PH, Ross-Cisneros FN, Walker SO, Carelli V. Leber's hereditary optic neuropathy differentially affects smaller axons in the optic nerve. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 2000;98:223-32; discussion 232-5.
- ✓ Scarpulla RC. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial **biogenesisbiogenesis** and function. *Physiol Rev.* 2008 Apr;88(2):611-38. doi: 10.1152/physrev.00025.2007.
- ✓ Setchell KD. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *Am J Clin Nutr.* 1998 Dec;68(6 Suppl):1333S-1346S.
- ✓ Shankar SP, Fingert JH, Carelli V, Valentino ML, King TM, Daiger SP, Salomao SR, Berezovsky A, Belfort R Jr, Braun TA, Sheffield VC, Sadun AA, Stone EM. Evidence for



a novel x-linked modifier locus for leber hereditary optic neuropathy. *Ophthalmic Genet.* 2008 Mar;29(1):17-24. doi: 10.1080/13816810701867607.

- ✓ Siow RC, Li FY, Rowlands DJ, de Winter P, Mann GE. Cardiovascular targets for estrogens and phytoestrogens: transcriptional regulation of nitric oxide synthase and antioxidant defense genes. *Free Radic Biol Med.* 2007 Apr 1;42(7):909-25. Epub 2007 Jan 8.
- ✓ Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet.* 2005 May;6(5):389-402.
- ✓ Wallace DC, Melov S. Radicals r'aging. *Nat Genet.* 1998 Jun;19(2):105-6.
- ✓ Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AM, Elsas LJ 2nd, Nikoskelainen EK. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science.* 1988 Dec 9;242(4884):1427-30.
- ✓ Wenz T, Diaz F, Spiegelman BM, Moraes CT. Activation of the PPAR/PGC-1alpha pathway prevents a bioenergetic deficit and effectively improves a mitochondrial myopathy phenotype. *Cell Metab.* 2008 Sep;8(3):249-56. doi: 10.1016/j.cmet.2008.07.006.
- ✓—Yaffe MP. The machinery of mitochondrial inheritance and behavior. *Science.* 1999 Mar 5;283(5407):1493-7.
- ✓ Yang SH, Liu R, Perez EJ, Wen Y, Stevens SM Jr, Valencia T, Brun-Zinkernagel AM, Prokai L, Will Y, Dykens J, Koulen P, Simpkins JW Mitochondrial localization of estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Mar 23;101(12):4130-5. Epub 2004 Mar 15.
- ✓ Yen MY, Chen CS, Wang AG, Wei YH. Increase of mitochondrial DNA in blood cells of patients with Leber's hereditary optic neuropathy with 11778 mutation. *Br J Ophthalmol.* 2002 Sep;86(9):1027-30.
- ✓ Yu-Wai-Man P, Griffiths PG, Chinnery PF. Mitochondrial optic neuropathies - disease mechanisms and therapeutic strategies. *Prog Retin Eye Res.* 2011 Mar;30(2):81-114. doi: 10.1016/j.preteyeres.2010.11.002. Epub 2010 Nov 26.
- ✓ Zanna C, Ghelli A, Porcelli AM, Martinuzzi A, Carelli V, Rugolo M. Caspase-independent death of Leber's hereditary optic neuropathy cybrids is driven by energetic failure and mediated by AIF and Endonuclease G. *Apoptosis.* 2005; 10: 997–1007.
- ✓ Zeviani M, Di Donato S. Mitochondrial disorders. *Brain.* 2004 Oct;127(Pt 10):2153-72. Epub 2004 Sep 9.
- ✓ Zhao L, Mao Z, Brinton RD. A select combination of clinically relevant phytoestrogens enhances estrogen receptor beta-binding selectivity and neuroprotective activities in vitro

Formattato: Puntato + Livello:1 + Allinea a: 0,63 cm +  
Imposta un rientro di: 1,27 cm

Formattato: Italiano (Italia)

and in vivo. *Endocrinology*. 2009 Feb;150(2):770-83. doi: 10.1210/en.2008-0715. Epub 2008 Sep 25.

- ✓ Ziegler RG. Phytoestrogens and breast cancer. *Am J Clin Nutr*. 2004 Feb;79(2):183-4.

<b>Pagina 2: [1] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: Times New Roman, 12 pt		
<b>Pagina 2: [2] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: Times New Roman, 12 pt		
<b>Pagina 2: [3] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: Times New Roman, 12 pt		
<b>Pagina 2: [4] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: Times New Roman, 12 pt		
<b>Pagina 2: [5] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: Times New Roman, 12 pt		
<b>Pagina 2: [6] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: Times New Roman, 12 pt		
<b>Pagina 2: [7] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: Times New Roman, 12 pt		
<b>Pagina 3: [8] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt		
<b>Pagina 3: [8] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt		
<b>Pagina 3: [8] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt		
<b>Pagina 3: [8] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt		
<b>Pagina 3: [9] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt		
<b>Pagina 3: [9] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt		
<b>Pagina 3: [9] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt		
<b>Pagina 3: [9] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt		

<b>Pagina 3: [10] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt, Non Corsivo		
<b>Pagina 3: [10] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt, Non Corsivo		
<b>Pagina 3: [10] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt, Non Corsivo		
<b>Pagina 3: [10] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt, Non Corsivo		
<b>Pagina 3: [11] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt, Non Corsivo		
<b>Pagina 3: [11] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt, Non Corsivo		
<b>Pagina 3: [12] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt		
<b>Pagina 3: [12] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt		
<b>Pagina 3: [13] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt, Non Corsivo		
<b>Pagina 3: [13] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt, Non Corsivo		
<b>Pagina 3: [14] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt, Non Corsivo		
<b>Pagina 3: [14] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt, Non Corsivo		
<b>Pagina 3: [15] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt, Non Corsivo		
<b>Pagina 3: [15] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt, Non Corsivo		
<b>Pagina 3: [16] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt, Non Corsivo		

<b>Pagina 3: [16] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt, Non Corsivo		
<b>Pagina 3: [17] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt, Non Corsivo		
<b>Pagina 3: [17] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt, Non Corsivo		
<b>Pagina 3: [18] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt		
<b>Pagina 3: [18] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt		
<b>Pagina 3: [19] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt, Non Corsivo		
<b>Pagina 3: [19] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt, Non Corsivo		
<b>Pagina 3: [20] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt, Non Corsivo		
<b>Pagina 3: [20] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt, Non Corsivo		
<b>Pagina 3: [21] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt, Non Corsivo		
<b>Pagina 3: [21] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt, Non Corsivo		
<b>Pagina 3: [22] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt, Non Corsivo		
<b>Pagina 3: [22] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt, Non Corsivo		
<b>Pagina 3: [23] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt, Non Corsivo		
<b>Pagina 3: [23] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt, Non Corsivo		

<b>Pagina 3: [24] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
----------------------------------	-------------------	----------------------------

Tipo di carattere: 12 pt

<b>Pagina 3: [24] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
----------------------------------	-------------------	----------------------------

Tipo di carattere: 12 pt

<b>Pagina 3: [25] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
----------------------------------	-------------------	----------------------------

Tipo di carattere: 12 pt

<b>Pagina 3: [25] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
----------------------------------	-------------------	----------------------------

Tipo di carattere: 12 pt

<b>Pagina 3: [25] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
----------------------------------	-------------------	----------------------------

Tipo di carattere: 12 pt

<b>Pagina 3: [25] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
----------------------------------	-------------------	----------------------------

Tipo di carattere: 12 pt

<b>Pagina 3: [26] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
----------------------------------	-------------------	----------------------------

Tipo di carattere: 12 pt

<b>Pagina 3: [26] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
----------------------------------	-------------------	----------------------------

Tipo di carattere: 12 pt

<b>Pagina 3: [26] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
----------------------------------	-------------------	----------------------------

Tipo di carattere: 12 pt

<b>Pagina 3: [26] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
----------------------------------	-------------------	----------------------------

Tipo di carattere: 12 pt

<b>Pagina 3: [27] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
----------------------------------	-------------------	----------------------------

Tipo di carattere: 12 pt

<b>Pagina 3: [27] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
----------------------------------	-------------------	----------------------------

Tipo di carattere: 12 pt

<b>Pagina 4: [28] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
----------------------------------	-------------------	----------------------------

Tipo di carattere: 12 pt

<b>Pagina 4: [28] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
----------------------------------	-------------------	----------------------------

Tipo di carattere: 12 pt

<b>Pagina 4: [29] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
----------------------------------	-------------------	----------------------------

Tipo di carattere: 12 pt

<b>Pagina 4: [29] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt		
<b>Pagina 4: [30] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt		
<b>Pagina 4: [30] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt		
<b>Pagina 4: [31] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt		
<b>Pagina 4: [31] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt		
<b>Pagina 4: [32] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt		
<b>Pagina 4: [32] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt		
<b>Pagina 4: [33] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt		
<b>Pagina 4: [33] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt		
<b>Pagina 4: [34] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt		
<b>Pagina 4: [34] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt		
<b>Pagina 4: [35] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt		
<b>Pagina 4: [35] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt		
<b>Pagina 4: [36] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt		
<b>Pagina 4: [36] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt		

<b>Pagina 4: [37] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt		
<b>Pagina 4: [37] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt		
<b>Pagina 4: [38] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt		
<b>Pagina 4: [38] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt		
<b>Pagina 4: [39] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt		
<b>Pagina 4: [39] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt		
<b>Pagina 4: [40] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt		
<b>Pagina 4: [40] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt		
<b>Pagina 4: [41] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt		
<b>Pagina 4: [41] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt		
<b>Pagina 4: [42] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt		
<b>Pagina 4: [42] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt		
<b>Pagina 4: [42] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt		
<b>Pagina 4: [42] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt		
<b>Pagina 4: [43] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt		



<b>Pagina 4: [43] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt		
<b>Pagina 4: [43] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt		
<b>Pagina 4: [43] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt		
<b>Pagina 4: [44] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt, Non Corsivo		
<b>Pagina 4: [44] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt, Non Corsivo		
<b>Pagina 4: [45] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt, Non Corsivo		
<b>Pagina 4: [45] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt, Non Corsivo		
<b>Pagina 4: [46] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt, Non Corsivo		
<b>Pagina 4: [46] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt, Non Corsivo		
<b>Pagina 4: [47] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt		
<b>Pagina 4: [47] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt		
<b>Pagina 4: [48] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt, Non Corsivo		
<b>Pagina 4: [48] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt, Non Corsivo		
<b>Pagina 4: [49] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt, Non Corsivo		
<b>Pagina 4: [49] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
Tipo di carattere: 12 pt, Non Corsivo		

<b>Pagina 4: [50] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
----------------------------------	-------------------	----------------------------

Tipo di carattere: 12 pt, Non Corsivo

<b>Pagina 4: [50] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
----------------------------------	-------------------	----------------------------

Tipo di carattere: 12 pt, Non Corsivo

<b>Pagina 4: [51] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
----------------------------------	-------------------	----------------------------

Tipo di carattere: 12 pt, Non Corsivo

<b>Pagina 4: [51] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
----------------------------------	-------------------	----------------------------

Tipo di carattere: 12 pt, Non Corsivo

<b>Pagina 4: [52] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
----------------------------------	-------------------	----------------------------

Tipo di carattere: 12 pt, Non Corsivo

<b>Pagina 4: [52] Formattato</b>	<b>LABdAmatil</b>	<b>07/03/2014 18:38:00</b>
----------------------------------	-------------------	----------------------------

Tipo di carattere: 12 pt, Non Corsivo