

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



**DOTTORATO DI RICERCA IN
FISIOPATOLOGIA CLINICA E MEDICINA SPERIMENTALE
XXII Ciclo 2006 - 2009**

COORDINATORE: PROF. GIANNI MARONE

TESI DI DOTTORATO

IL RESVERATROLO PROTEGGE IL CERVELLO DEI RATTI DAL
DANNO ISCHEMICO CEREBRALE ATTRAVERSO LA VIA SIRT₁-UCP₂

TUTORE

Chiar.mo Prof.
Pasquale Abete

CANDIDATO

Dott. David Della Morte

INDICE

<i>Introduzione</i>	<i>Pag. 3</i>
<i>Materiali e Metodi</i>	<i>Pag. 5</i>
<i>Risultati</i>	<i>Pag. 12</i>
<i>Discussione</i>	<i>Pag. 17</i>
<i>Conclusioni</i>	<i>Pag. 21</i>
<i>Ringraziamenti</i>	<i>Pag. 22</i>
<i>Bibliografia</i>	<i>Pag. 23</i>
<i>Tabelle</i>	<i>Pag. 28</i>
<i>Figure</i>	<i>Pag. 29</i>

INTRODUZIONE

L'ischemia cerebrale e l'arresto cardiocircolatorio sono le principali cause di disabilità nei paesi occidentali (Krause, 1986). Numerosi studi hanno dimostrato come brevi e ripetuti insulti ischemici sono in grado di ridurre l'effetto deleterio di un successivo episodio ischemico più prolungato nel cuore, nel cervello ed in altri organi, (Dirnagl, 2003). Questo meccanismo di protezione endogena è conosciuto con il nome di Precondizionamento Ischemico (PI).

Il resveratrolo (3,5,4'-triidrossistilbene) è un polifenolo presente in numerose piante e specialmente nell'uva e nel vino (Hao and He, 2004). In passato, diversi ricercatori hanno dimostrato come un regolare consumo di vino rosso fosse in grado di ridurre il rischio di aterosclerosi e di malattie cardiovascolari (Hao and He, 2004) e come, il resveratrolo, fosse in grado di proteggere il cuore, il cervello e i reni dal danno da ischemia/riperfusion (Raval, 2008). Recentemente, uno studio *in vitro*, ha dimostrato come il pretrattamento con resveratrolo sia in grado di indurre neuroprotezione nei confronti dell'ischemia cerebrale mimando il PI (Raval, 2006). La Sirtuina 1 (SIRT1), membro della famiglia delle sirtuine, proteine deacetilasi nicotinammide adenina dinucleotide (NAD⁺)-dipendenti (Borra, 2005), è stata identificata come mediatore fondamentale in questo tipo di neuroprotezione (Raval, 2006). Altri studi hanno evidenziato come il resveratrolo sia in grado di aumentare l'attività di SIRT1 di 8 volte (Borra, 2005).

SIRT1 è una proteina implicata in numerosi processi come la regolazione del ciclo cellulare, il metabolismo degli acidi grassi, la degenerazione dell'assone, la differenziazione delle cellule muscolari e l'incremento dell'aspettativa di vita (Michan and Sinclair, 2007). Uno degli organelli che mediano la neuroprotezione indotta da SIRT1 è il mitocondrio. Bordone e colleghi (Bordone, 2006) hanno dimostrato come SIRT1 sia in grado di reprimere la trascrizione di Uncoupling Protein 2 (UCP2)

legandosi direttamente al suo promoter. Moynihan e colleghi (Moynihan, 2005) hanno osservato in topi transgenici modificati per iperesprimere SIRT1, una riduzione dei livelli di UCP2 nelle cellule beta pancreatiche. Nello stesso studio, i ricercatori hanno dimostrato come ai minori livelli di UCP2, indotti all'iperpressione di SIRT1, corrispondesse un'aumentata produzione di Adenosinatrifosfato (ATP) con un conseguente aumento del rilascio di insulina. Altri studi hanno evidenziato il ruolo fondamentale di UCP2 nel controllo della produzione dei radicali liberi dell'ossigeno (ROS) (Lee, 1999; Arsenijevic, 2000). La UCP2 e' risultata essenziale anche nel riassorbimento del Ca⁺ a livello mitocondriale, azione fondamentale nella regolazione dei processi di fosforilazione ossidativa (Trenker, 2007). Le vie regolate dal resveratrolo e dall'attivazione di SIRT1 sono riassunte nella Figura 1.

I principali obiettivi del presente studio sono stati: 1. Determinare la capacità del resveratrolo di mimare il PI nella protezione anti-ischemica della regione del cornu ammonis 1 (CA1) dell'Ippocampo dei ratti; 2. Definire il ruolo della via SIRT1-UCP2 nella tolleranza all'ischemia cerebrale indotta dal resveratrolo.

MATERIALI E METODI

Sostanze

Il resveratrolo (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) è stato dissolto in soluzione contenente salina (0.9% NaCl): Solutol miscelati con un rapporto 7:3 (BASF, Wyandotte, MI, USA) e iniettato per via intraperitoneale (i.p.). Il sirtinolo (Sigma), specifico inibitore dell'attività di SIRT1 (Grozingher, 2001), è stato dissolto nel dimetile sulfossido (DMSO) (Sigma) a 1mM di concentrazione. Dieci microlitri di sirtinolo sono stati iniettati per via intracerebroventricolare (ICV) nel ventricolo cerebrale sinistro alle seguenti coordinate (bregma: - 0.8 mm, laterale: 1.5 mm, profondità: 3.5 mm) e alla velocità di 60 µl/ora (Zhang, 2006).

Disegno Sperimentale

Descrizione dei gruppi sperimentali (Figura 2):

Gruppo 1. Sham arresto cardiaco (AC) (n=6) – Ratti sottoposti a chirurgia di tipo sham.

Gruppo 2. Test Ischemia/Veicolo controllo (n=10) – 8 minuti di AC venivano indotti 48 ore dopo iniezione di salina (2 ml/kg di peso corporeo).

Gruppo 3. PI + AC (n=6) – 2 minuti di ischemia cerebrale globale veniva indotta 48 ore prima dell' induzione di 8 minuti di AC.

Gruppo 4. 10 mg/kg di resveratrolo + AC (n=8) – il resveratrolo veniva iniettato i.p. alla dose di 10 mg/kg di peso corporeo 48 ore prima dell'induzione di 8 minuti di AC.

Gruppo 5. 50 mg/kg di resveratrolo + AC (n=8) – il resveratrolo veniva iniettato i.p. alla dose di 50 mg/kg di peso corporeo 48 ore prima dell'induzione di 8 minuti di AC.

Gruppo 6. 100 mg/kg di resveratrolo + AC (n=8) – il resveratrolo veniva iniettato i.p. alla dose di 100 mg/kg di peso corporeo 48 ore prima dell'induzione di 8 minuti di AC.

Gruppo 7. DMSO (ICV veicolo) + AC (n=5) – 10 µl di DMSO venivano iniettati ICV 48 ore prima dell'induzione di 8 minuti di CA.

Gruppo 8. Resveratrolo + DMSO + AC (n=5) - 10 µl di DMSO venivano iniettati ICV immediatamente dopo iniezione per via i.p. di resveratrolo (10 mg/kg di peso corporeo). 48 ore dopo venivano indotti 8 minuti di AC.

Gruppo 9. Sirtinolo ICV + AC (n=5) – 3.94 µg di sirtinolo venivano iniettati ICV.

Gruppo 10. Sirtinolo ICV + AC (n=5) - 3.94 µg di sirtinolo venivano iniettati ICV 48 ore prima dell'induzione di 8 minuti di AC.

Gruppo 11. Resveratrolo + Sirtinolo + AC (n=5) - 3.94 µg di sirtinolo venivano iniettati ICV immediatamente dopo iniezione per via i.p. di resveratrolo (10 mg/kg di peso corporeo). 48 ore dopo venivano indotti 8 minuti di AC.

Precondizionamento Ischemico (PI)

Tutte le procedure chirurgiche praticate sugli animali erano in accordo con le linee *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the National Institutes of Health* e approvate da *The Animal Care and Use Committee of the University of Miami*. Il numero degli animali e la loro sofferenza è stata ridotta al minimo per ogni gruppo sperimentale. Per ogni procedura chirurgica sono stati utilizzati ratti di tipo Sprague-Dawley (SD) del peso di 250-350 gr., anestetizzati con 4% di Isoflurano, con ossigeno e ossido nitrico miscelati al rapporto di 30:70, ed intubati per via endotracheale. Il PI è stato indotto usando 2 minuti di ischemia cerebrale globale praticata mediante chiusura bilaterale delle carotidi. Durante la legatura delle carotidi, dall'arteria femorale veniva prelevato sangue sino al

raggiungimento di una pressione arteriosa pari a 45-50 mmHg. Il sangue (mantenuto a 36-37 °C) veniva quindi nuovamente iniettato allo riapertura delle carotidi ristabilendo la normotensione (Perez-Pinzon, 1997). Gli animali rimanevano collegati al respiratore sino al ripristino della respirazione spontanea.

Arresto Cardiaco (AC)

Come descritto precedentemente (Dave, 2004), l'AC veniva indotto attraverso la disconnessione del ventilatore dal tubo endotracheale. Otto minuti dopo l'inizio dell'asfissia venivano iniziate le manovre di rianimazione: somministrazione di epinefrina per via intravenosa (i.v.) (0.0005 mg/kg) e bicarbonato sodico (1 mEq/kg i.v.) seguita da ventilazione meccanica con erogazione di O₂ al 100% e massaggio cardiaco alla frequenza di 200/minuto sino a al raggiungimento di una pressione arteriosa media di 60 mmHg e un battito cardiaco spontaneo per più di 10 secondi. Una volta che gli animali erano emodinamicamente stabili, con una respirazione di tipo spontaneo, condizione che si realizzava generalmente dopo 10-15 minuti dal ripristino della circolazione spontanea, i cateteri venivano rimossi e gli animali estubati anche se O₂ al 100% continuava ad essere erogato attraverso la maschera facciale. La temperatura corporea e quella cerebrale venivano mantenute a 37 °C usando la lampada al calore per 1 ora. Gli animali controllo (sham AC) venivano sottoposti ad una procedura chirurgica del tutto simile al gruppo AC eccetto che per l'induzione dell'AC. La temperatura e il peso corporeo venivano monitorizzati sino al 7° giorno e non erano presenti significative differenze tra i gruppi (Tabella 1).

Istopatologia

Dopo 7 giorni dall'AC, i ratti venivano anestetizzati con isoflurano e perfusi con una miscela di 40% di formaldeide, acido glacialacetico e metanolo miscelate in

rapporto di 1:1:8 (Perez-Pinzon, 1997). I cervelli venivano quindi rimossi dalla scatola cranica e trattati con paraffina; le sezioni coronali venivano tagliate allo spessore di 10 µm e colorate con metodo ematossilina/eosina. L'intero Ippocampo veniva esaminato anteriormente e posteriormente. La conta dei neuroni normali veniva effettuata all'interno della regione CA1 dell'Ippocampo a livello di 3.8 mm posteriormente al bregma. I neuroni che esibivano modificazioni cellulari relative all'ischemia venivano identificati attraverso: 1) citoplasma eosinofilo, 2) colorazione scura degli agglomerati nucleari, 3) colorazione eosinofila del nucleolo. Per ogni gruppo di ratti sottoposti ad ischemia i neuroni venivano contati su 18 linee per sezione, dalla parte mediale sino a quella laterale, lungo tutta la regione CA1 dell'Ippocampo.

Misurazione dell'attività di SIRT1

Per misurare l'attività di SIRT1 il tessuto cerebrale veniva prelevato dall'Ippocampo dopo 1 e 48 ore dall'induzione del PI e dal pretrattamento con resveratrolo. L'estratto nucleare veniva frazionato usando la tecnica, precedentemente descritta in dettaglio, da Raval e colleghi (Raval, 2006). L'attività enzimatica di SIRT1 veniva misurata usando il kit basato sul peptide substrato fluor de Lys-SIRT1 (BioMol International, Plymouth Meeting, PA, USA), in grado di misurare l'attività enzimatica di SIRT1 tramite fluorescenza. La sensibilità all'attivazione della suramina veniva considerata come attività enzimatica di SIRT1.

Western Blot

Per effettuare l'analisi del Western Blot, le frazioni mitocondriali venivano preparate secondo le procedure successivamente descritte. Le frazioni mitocondriali venivano quindi analizzate per il contenuto proteico usando il kit Bio-Rad protein

assay basato sul metodo Bradford (Bradford, 1976). Un' uguale quantità di proteine per ogni gruppo sperimentale veniva fatta correre nello stesso gel e analizzata nello stesso momento. Le proteine venivano quindi trasferite su membrana Immobilon-P (Millipore, Billerica, MA, USA) ed incubate con anticorpi primari anti-UCP2 (1:1000) (Chalbiochem, Gibbstown, NJ, USA) e anti citocromo C ossidasi IV (COX IV) (1:1000) (Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA). L'immunoreattività veniva rilevata usando l'incremento della chemiluminescenza (Amersham-Pharmacia Biothech., Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). La digitalizzazione delle tracce immunomarcate veniva analizzata con analisi densitometrica.

Isolamento dell'RNA e analisi dell'espressione genetica Taqman

L'RNA totale veniva isolato dall'Ippocampo di ratto usando il QIAGEN miRNeasy mini kit (Valencia, CA, USA). Un microgrammo di RNA totale veniva inversamente trascritto usando il kit per trascrizione inversa con DNA complementare (cDNA) ad alta capacità. Il real-time Taqman polymerase chain reaction (PCR) veniva effettuato per i livelli di trascrizione delle UCP2 nei gruppi di ratti sham e trattati con resveratrolo. La β -actina veniva utilizzata come controllo per il calcolo del ΔC_T . Ad ogni misurazione le medie del ΔC_T per i campioni del gruppo sham venivano usate come calibratore per il calcolo di $\Delta\Delta C_T$. La media di $\Delta\Delta C_T$ per ogni gruppo veniva, quindi, utilizzata per calcolare la relativa espressione di UCP2 ($2^{\Delta\Delta C_T}$). Di conseguenza, l'espressione relativa dei livelli riportati nel presente studio sono stati calibrati attraverso il gruppo sham e normalizzati per controllo interno. Per ulteriori dettagli su questo metodo di misurazione consultare (Pfaffl, 2002). Sono state usate le seguenti sonde/primer specifiche per geni: β -actina (Rm00667869-m1) e UCP2 (Rn01754856-m1). La PCR veniva effettuata usando 15 ng di cDNA su 7300 PCR Sequence Detection System. Il ciclo termico della PCR veniva effettuato secondo

le istruzioni del prodotto. Tutti i reagenti e gli strumenti sono stati forniti da Applied Biosystems, Foster City, CA, USA. Tutte le misurazioni venivano praticate tre volte.

Isolamento dei mitocondri dai neuroni dell'Ippocampo e Studio Polarografico

I mitocondri dei neuroni dell'Ippocampo venivano isolati secondo le procedure precedentemente descritte (Lee CP, 1993). I tassi di ossidazione dei substrati e le capacità polarografiche venivano determinate nei mitocondri isolati attraverso il metodo descritto da Hofhaus (Hofhaus, 1996). In breve, il consumo di O₂ veniva misurato polarograficamente in una soluzione contenente 150 mM di sucrosio, 25 mM Tris-HCl (pH 7.4) e 10 mM di potassio fosfatasi tampone (pH 7.4). L'indice di controllo respiratorio (ICR) e il rapporto delle moli di ADP fosforilate per moli di O₂ consumate (ADP/O), venivano misurate in presenza di 5 mM di piruvato e 2.5 mM di malato. L'ICR veniva definito come il rapporto tra lo stato di respirazione in presenza ed in assenza di ADP (stato₃/stato₄) (Chance and Williams, 1956).

Misurazione del potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\Psi_m$)

Il $\Delta\Psi_m$ è stato determinato usando 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzomidazol-carbocianina iodato (JC1) (Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA), come descritto precedentemente (Dave et al., 2008). Alla fine degli esperimenti, carbonilcianide-p-trifluorometoxyfenilidrazone (FCCP), 1 μ M (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) veniva aggiunto come controllo negativo. Il $\Delta\Psi_m$ veniva espresso come rapporto tra la fluorescenza rilevata a 590 nm e la fluorescenza rilevata a 525 nm.

Analisi Statistica

Tutti i dati sono stati espressi come media \pm SEM. La validità statistica dei dati è stata effettuata usando il test di ANOVA seguito dal test di Bonferroni. Una $p < 0.05$ veniva considerata come statisticamente significativa.

RISULTATI

Il pretrattamento con il resveratrolo in vivo mima il preconditionamento ischemico

Abbiamo testato l'ipotesi che il pretrattamento *in vivo* con resveratrolo iniettato i.p. potesse indurre neuroprotezione nei confronti dell'ischemia cerebrale. Prima e dopo l'induzione dell' AC o dello sham AC, i parametri fisiopatologici, inclusi pO₂, pCO₂, HCO₃⁻ e la concentrazione di glucosio nel plasma erano simili in tutti i gruppi sperimentali di ratti (Tabella 1). Durante l'induzione di AC, tutti i gruppi evidenziavano un'immediata bradicardia all'inizio dello stato asfittico, seguita da marcata ipotensione sino a 50 mmHg (Figura 3). L'elettrocardiogramma ritornava alla normalità entro 5 minuti dal ripristino della circolazione spontanea. Non erano presenti differenze significative nei parametri fisiopatologici tra i diversi gruppi sperimentali (Tabella 1).

Sette giorni dopo rianimazione dall'AC veniva effettuata una valutazione istologica dei neuroni morti nella regione CA1 dell'Ippocampo (Figure 4A e 6A). Il numero dei neuroni vivi nell'Ippocampo dei ratti del gruppo sham era 1226±72 (n=6). Nel gruppo dei ratti trattati con veicolo, dopo AC, il numero dei neuroni vivi nell'Ippocampo si riduceva a 199±11 (n=10). Il pretrattamento con resveratrolo (10 o 50 mg/kg, n=8) o PI (n=6) aumentava in maniera significativa il numero dei neuroni vivi rispettivamente del 221%, 175%, e del 261% (Figure 3A, B). In accordo con i dati del precedente studio *in vitro* (Raval, 2006), alte dosi di resveratrolo (100 mg/kg) (n=8) non risultavano essere neuroprotettive nei confronti dell'ischemia cerebrale (Figura 4A, B). I presenti dati dimostrano come la neuroprotezione indotta dal resveratrolo e dal PI possono avere in comune le stesse vie di attivazione molecolare.

L'attività di SIRT1 aumenta nell'Ippocampo del ratto dopo Preconditionamento Ischemico e pretrattamento con resveratrolo

Un nostro precedente studio, *in vitro*, ha dimostrato come l'attività di SIRT1 aumentava 48 ore dopo PI e 30 minuti dopo pretrattamento con resveratrolo (Raval, 2006). Basando la nostra esperienza su questi risultati, abbiamo misurato nell'Ippocampo di ratto l'attività di SIRT1 ad 1 ora e a 48 ore dopo PI e dopo pretrattamento con resveratrolo. Per pretrattare i ratti con resveratrolo, abbiamo scelto la dose che è risultata essere maggiormente neuroprotettiva (10 mg/kg). Il PI aumentava in maniera significativa l'attività di SIRT1 nell'Ippocampo del 29% ($p < 0.05$, $n=4$) dopo 48 ore ma non dopo 1 ora dal trattamento. Al contrario, il pretrattamento con resveratrolo aumentava significativamente l'attività di SIRT1 nell'Ippocampo del 36% ($p < 0.05$, $n=4$) ad 1 ora ma non dopo 48 ore dal trattamento (Figura 5A). L'iniezione ICV del sirtinolo senza induzione del PI riduceva l'attività di SIRT1 di circa il 70% nell'Ippocampo di ratto. (Figura 5B).

L'iniezione ICV di sirtinolo blocca la capacità del resveratrolo di indurre neuroprotezione

Per determinare se l'aumento dell'attività di SIRT1 fosse necessario per indurre la tolleranza all'ischemia mediata dal pretrattamento con resveratrolo, abbiamo testato se il sirtinolo (specifico inibitore dell'attività di SIRT1) fosse in grado di bloccare questo tipo di neuroprotezione. Il sirtinolo iniettato ICV 48 ore prima dell'AC è risultato in grado di bloccare la neuroprotezione indotta dal resveratrolo (numero dei neuroni vivi 366 ± 52 , $p < 0.05$) se paragonato con i gruppi di ratti pretrattati con PI e resveratrolo (10 e 50 mg/kg). L'iniezione ICV di DMSO (veicolo per sirtinolo) non modificava il numero di neuroni morti (243 ± 80), mentre il pretrattamento con resveratrolo alle dosi protettive, più l'iniezione ICV di DMSO risultava comunque capace di indurre neuroprotezione (647 ± 58 , $p < 0.05$) (Figura 6A,B). Il sirtinolo da solo, usato come controllo, non cambiava significativamente il

numero dei neuroni vivi (1115 ± 84 , $n=5$) e nemmeno aumentava il numero di cellule morte dopo AC (212 ± 49 , $n=5$) (Figura 6A,B). Concludendo, i nostri risultati ottenuti mediante l'utilizzo del sirtinolo, antagonista dell'attività di SIRT1, dimostrano come un aumento dell'attività di SIRT1 sia fondamentale nella neuroprotezione indotta dal resveratrolo. Siccome SIRT1 è in grado di modulare l'espressione di UCP2 nei mitocondri abbiamo successivamente testato l'effetto del resveratrolo sulla funzione mitocondriale.

Il pretrattamento con resveratrolo diminuisce i livelli di UCP2 nei mitocondri isolati dai neuroni di Ippocampo di ratto

L'attività di SIRT1 è stata dimostrata capace di modulare i livelli di UCP2 nei mitocondri (Moynihan, 2005; Bordone, 2006). Per questo motivo abbiamo testato la capacità del pretrattamento con resveratrolo di ridurre o meno i livelli di UCP2 nei mitocondri isolati dall'Ippocampo. Il pretrattamento con resveratrolo (10 mg/kg, dose maggiormente neuroprotettiva) era in grado di diminuire i livelli di UCP2 del $65.1\% \pm 2.1\%$ ($p < 0.05$, $n=4$) dopo 48 ore dal trattamento se paragonato al gruppo di ratti trattati con veicolo ($n=4$) (Figura 7A). Il sirtinolo, inibitore di SIRT1, bloccava la capacità del resveratrolo di ridurre i livelli di UCP2 ($118\% \pm 14\%$, $n=4$) (Figura 7B). Questi dati dimostrano l'implicazione della via SIRT1-UCP2 nel preconditionamento indotto dal resveratrolo.

Un potenziale meccanismo attraverso il quale SIRT1 può ridurre i livelli di UCP2 è attraverso la soppressione dei livelli del mRNA della UCP2. Noi abbiamo verificato questa ipotesi usando la metodica PCR. Abbiamo misurato i livelli di mRNA di UCP2 nell'Ippocampo dei ratti trattati con resveratrolo comparati ai livelli di β -actina e calibrati per i livelli di mRNA di UCP2 nel gruppo dei ratti trattati con

veicolo. Non sono state evidenziate significative differenze tra i due gruppi per la relativa espressione di UCP2 a 6 ore (0.87 ± 0.34 , $n=6$), a 12 ore (0.93 ± 0.17 , $n=6$) e a 24 ore (1.23 ± 0.39 , $n=3$) dal trattamento.

Effetto del pretrattamento con resveratrolo nella fisiologia mitocondriale

Il cambiamento nei livelli mitocondriali di UCP2 potrebbe alterare il potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\Psi_m$). Per questo motivo, abbiamo misurato il $\Delta\Psi_m$ nei mitocondri dei ratti trattati con resveratrolo e in quelli trattati con veicolo dopo 48 ore dal trattamento (Mills, 2002). Il $\Delta\Psi_m$ nel gruppo trattato con resveratrolo (31.4 ± 3.6 , $n=4$) (rapporto di fluorescenza: 590 nm diviso per 525 nm) non era significativamente differente se paragonato con il gruppo di ratti trattato con veicolo (32.3 ± 3.4 , $n=4$) (Figura 8A). Questi dati ci suggeriscono che la diminuzione nei livelli di UCP2 non modifica significativamente il $\Delta\Psi_m$. Un'altra possibile modificazione successiva al trattamento con resveratrolo potrebbe essere nella produzione di ATP (Moynihan, 2005; Bodyak, 2007). Di conseguenza, abbiamo verificato se il pretrattamento con resveratrolo aveva effetti su la capacità di sintesi dell'ATP attraverso la misurazione della respirazione mitocondriale. La media del tasso della respirazione nello stato 3 (tasso di respirazione in presenza di ADP) e stato 4 (tasso di respirazione in assenza di ADP) non cambiava significativamente tra i gruppi trattati con resveratrolo ($n=4$), con veicolo ($n=4$) e con resveratrolo più sirtinolo ($n=4$) (Figura 8B). Successivamente, abbiamo confrontato l'ICR e il rapporto ADP/O (definiti precedentemente nelle procedure sperimentali) tra i tre differenti gruppi di animali trattati, come un indice di efficienza della catena del trasporto elettronico mitocondriale. Non sono state osservate differenze significative tra i tre gruppi (Figura 8C). Nel gruppo di animali trattati con resveratrolo l'RCI era 3.75 ± 0.52 ($n=4$), paragonato a 3.98 ± 0.35 nel gruppo trattato con veicolo ($n=4$) e

3.88±0.67 (n=4) nel gruppo trattato con resveratrolo più sirtinolo (n=4). Una tipica traccia per il consumo di ossigeno in tutti e tre i gruppi di animali trattati è presente nella figura 8D. Nonostante questi dati, abbiamo comunque dimostrato un significativo aumento del 23% nel rapporto tra la produzione di ATP e il consumo di O₂ (rapporto ADP/O) nei mitocondri di Ippocampo isolati negli animali trattati con resveratrolo rispetto a quelli trattati con veicolo (3.03±0.10 vs. 3.73±0.10, veicolo vs. resveratrolo, n=4; p<0.02) (Figura 8E). Il sirtinolo era in grado di bloccare l'aumento del rapporto ADP/O (3.11±0.25, n=4, p<0.05) (Figura 8E). I presenti dati ci suggeriscono che livelli più bassi di UCP2 ottenuti dal pretrattamento con resveratrolo possono essere responsabili di un maggiore efficienza mitocondriale in termini di produzione di ATP.

DISCUSSIONE

Numerosi studi condotti negli animali e negli umani hanno chiaramente dimostrato come il PI sia in grado di proteggere organi differenti dall'insulto ischemico (Dirnagl, 2003; Yenari, 2008). Numerosi meccanismi cellulari sono stati implicati in questo meccanismo di protezione, tra i più studiati: l'attivazione della Proteina Chinasi C (PKC), dei canali del K⁺-ATP dipendenti, delle chinasi PI₃, dei recettori per l'adenosina e per il glutammato (Dirnagl, 2003; Gidday, 2006). Uno dei principali obiettivi per comprendere e sfruttare a pieno i meccanismi alla base della protezione indotta da PI è sviluppare nuove terapie in grado di mimare il PI. Un numero considerevole di composti chimici è stato dimostrato in grado di mimare il PI, tra i vari ricordiamo la solfanilurea, gli anestetici volatili, il levosimendan, l'eritropoietina, gli oppioidi e gli estrogeni (Dirnagl, 2003; Gidday, 2006; Yenari, 2008).

La forma biologicamente attiva del resveratrolo, il trans-resveratrolo, protegge una varietà di organi come il cuore, il cervello e i reni dal danno da ischemia riperfusione (Raval, 2008). Nel presente studio, abbiamo dimostrato come il pretrattamento *in vivo* con il resveratrolo induce tolleranza nei riguardi dell'insulto ischemico cerebrale e come questa neuroprotezione sia mediata dall'attivazione di SIRT1. Abbiamo inoltre dimostrato come pretrattando i ratti con basse dosi di resveratrolo 48 ore prima di indurre ischemia cerebrale eravamo in grado di attivare le stesse vie molecolari attivate dal PI. Il sirtinolo, specifico inibitore di SIRT1, era in grado di bloccare la neuroprotezione indotta dal resveratrolo, dimostrando un ruolo fondamentale di SIRT1 in questo tipo di neuroprotezione (Figura 6). In un precedente studio *in vitro*, abbiamo dimostrato come il sirtinolo è anche in grado di bloccare la neuroprotezione indotta dal PI (Raval, 2006).

Precedenti studi condotti nelle β cellule pancreatiche hanno dimostrato come l'attività di SIRT1 modula i livelli della UCP2 (Bordone, 2006). La UCP2 è una proteina, membro della famiglia di proteine presenti sulla membrana della matrice mitocondriale, capaci di mediare la sintesi di ATP attraverso la regolazione del gradiente elettrochimico di membrana (Esteves and Brand, 2005). Nonostante questo, il ruolo esatto della UCP2 nei mitocondri non è stato del tutto chiarito. La UCP2 è stata implicata nei processi di termogenesi, nel diabete, nei meccanismi di invecchiamento e nelle patologie di tipo immunologico, circolatorio e neurologico (Brand and Esteves, 2005).

Il pretrattamento con resveratrolo induce una diminuzione dei livelli di UCP2 nei mitocondri di Ippocampo dopo 48 ore dal trattamento. La diminuzione dei livelli di UCP2 viene bloccata dal trattamento con sirtinolo (Figura 7B). Di conseguenza, possiamo affermare che la regolazione dei livelli di UCP2 *in vivo* richiede l'attivazione di SIRT1. Nonostante i minori livelli di UCP2 nei mitocondri di Ippocampo di ratti pretrattati con resveratrolo, noi non abbiamo osservato nessun cambiamento nel $\Delta\Psi_m$. Questo potrebbe essere dovuto ai diversi meccanismi compensatori presenti nella membrana mitocondriale (Scheffler, 1999). In contrasto alla mancata differenza nel $\Delta\Psi_m$, noi abbiamo comunque osservato un significativo aumento nel rapporto ADP/O (Figura 7E), indicatore sensibile dell'efficienza mitocondriale nella sintesi di ATP. I livelli di ATP nel cervello possono essere mantenuti a lungo dopo un evento ischemico grazie alla capacità di sintesi mitocondriale. I nostri dati concordano con i risultati di precedenti studi condotti nei cardiomiociti e nel fegato in cui un aumento della sintesi di ATP è stato correlato ad una diminuzione dei livelli di UCP2 (Bodyak, 2007; Evans, 2007). Inoltre, i presenti dati ci suggeriscono che la regolazione nella sintesi di UCP2, indotta dal

pretrattamento con resveratrolo, è in grado di proteggere dall'insulto ischemico attraverso un'aumentata produzione di ATP mitocondriale (Figura 1).

Il ruolo neuroprotettivo di UCP2 nei riguardi dell'ischemia cerebrale non è ancora chiaramente definito. Da una parte, elevati livelli di UCP2 dopo PI sono risultati essere protettivi nei confronti dell'ischemia cerebrale e cardiaca (Mattiasson et al., 2003; McLeod et al., 2005), dall'altra, De Bilbao e colleghi hanno dimostrato un diminuzione del danno cerebrale post-ischemico nei topi knockout per UCP2 (de Bilbao, 2004). Inoltre, un altro studio recentemente ha dimostrato come l'iperespressione di UCP2 è in grado di proteggere la regione talamica contro l'ischemia ma non altre regioni del cervello come l'Ippocampo (Deierborg, 2008). In aggiunta a questi dati, altri ricercatori hanno dimostrato come l'iperespressione di UCP2 aumenta il numero di cellule morte dopo ischemia/riperfusionione nei cardiomiociti di ratti adulti (Bodyak, 2007). L'iperespressione di UCP2 aumenta la produzione di ROS e promuove il rilascio di idrogeno perossido dall'interno all'esterno dei mitocondri (de Bilbao et al., 2004). Di conseguenza, l'aumento di UCP2 altera i segnali cellulari redox (Arsenijevic, 2000; Mattiasson, 2003). In contrasto, una diminuzione dei livelli di UCP2 aumenta la produzione di ROS ma anche la capacità cellulare nella detossificazione da ROS attraverso un incremento nella sintesi di glutatione ridotto (GSH) e manganese superossido dismutasi mitocondriale (de Bilbao et al., 2004). Il comune denominatore, comunque, in entrambi le condizioni, overespressione o deplezione di UCP2 risulta essere una diminuzione nella produzione dei ROS. I nostri risultati suggeriscono che, oltre l'aumentata capacità anti-ROS, una diminuzione della UCP2 è collegata ad un aumento della capacità mitocondriale nella produzione di ATP.

L'importanza dei ROS dopo induzione di PI e nel danno successivo ad ischemia cerebrale è stata ampiamente studiata (Perez-Pinzon et al., 2005).

L'aumentata capacità cellulare di produrre i sistemi tampone contro i ROS è collegata ad un minore danno a livello delle proteine, del DNA e dei lipidi durante l'insulto da ischemia/riperfusion. Inoltre, i nostri risultati in termini del rapporto ADP/O, indicano una maggiore efficienza nella produzione mitocondriale di ATP. Pertanto, grazie a questi dati, nel presente studio dimostriamo come minori livelli della UCP2, successivi al pretrattamento con resveratrolo, inducano un aumento nella produzione mitocondriale di ATP e di conseguenza una protezione cellulare nei confronti dell'ischemia.

Come abbiamo descritto precedentemente, (Raval et al., 2006), sia il PI che il pretrattamento con resveratrolo risultavano neuroprotettivi nei confronti dell'ischemia, nonostante il tempo di attivazione di SIRT1 era differente nei due paradigmi. Come possiamo aspettarci, il resveratrolo aumenta rapidamente e per breve tempo l'attività di SIRT1, mentre il PI aumenta l'attività di SIRT1 solo poco prima dell'induzione dell'AC. Nonostante tutto, al momento non conosciamo esattamente il tempo esatto di durata dell'incremento dell'attività di SIRT1 successivo a trattamento con resveratrolo. I nostri dati indicano solamente che l'attività di SIRT1 ritorna al livello di base a 48 ore dal trattamento. Una veloce attivazione di SIRT1 successiva al trattamento con resveratrolo comporta una diminuzione dei livelli proteici di UCP2 dopo 48 ore senza nessun cambiamento significativo nei livelli di mRNA. Precedenti studi hanno dimostrato come l'espressione di UCP2 *in vivo* è regolata a livello trasduzionale senza nessun cambiamento nei livelli di mRNA per UCP2 (Pecqueur, 2001). L'emivita di UCP2 non è stata ancora del tutto definita e varia ampiamente da tessuto a tessuto (Pecqueur, 2001; Rousset, 2007). Noi pensiamo che il ritardo osservato nella diminuzione dei livelli di UCP2 dall'attivazione di SIRT1 successiva al trattamento con resveratrolo, sia dovuto ad una più lunga emivita di UCP2 nel cervello. Tutto sommato, i risultati

relativi al trattamento con resveratrolo indicano che l'aumento transitorio dell'attività di SIRT1 induce neuroprotezione almeno dopo 48 ore. La perdita della neuroprotezione, dovuta all'inibizione dell'attivazione di SIRT1 dopo il trattamento con resveratrolo, conferma l'evidenza che SIRT1 gioca un ruolo fondamentale per l'induzione dello stato di neuroprotezione. Ulteriori studi sono necessari per definire specificatamente i meccanismi attraverso i quali l'attivazione di SIRT1 promuove la diminuzione dei livelli proteici di UCP2. Inoltre, altri studi sono necessari per definire esattamente il periodo di tempo attraverso il quale il resveratrolo promuove la neuroprotezione dopo una singola somministrazione.

CONCLUSIONI

Concludendo, il pretrattamento *in vivo* con iniezione i.p. di resveratrolo alle dosi di 10 e 50 mg/kg risulta in grado di mimare il PI: il resveratrolo protegge la regione CA1 dell'Ippocampo nei confronti dell'ischemia cerebrale globale. Questa neuroprotezione dipende dall'attivazione di SIRT1, una deacetilasi NAD⁺-dipendente collegata attraverso la restrizione calorica all'incremento dell'aspettativa di vita. Inoltre, i presenti dati dimostrano come il pretrattamento con resveratrolo induce neuroprotezione attraverso la diminuzione dei livelli di UCP2 e il successivo incremento della produzione di ATP mitocondriale. Altri studi sono in corso per definire la presenza di altri meccanismi coinvolti nella neuroprotezione indotta dal resveratrolo contro il danno ischemico.

Comprendere a pieno i meccanismi comuni alla base della neuroprotezione indotta dal resveratrolo e dal PI può essere di grande aiuto nello sviluppare nuove strategie terapeutiche contro l'ischemia cerebrale. I nostri risultati sono di incoraggiamento per fondare un nuovo approccio neuroprotettivo basato sulla

regolazione del metabolismo mitocondriale, in quei pazienti ad alta probabilità di ischemia cerebrale.

RINGRAZIAMENTI

Questo studio è stato reso possibile grazie ai finanziamenti ottenuti dai seguenti grants: PHS grants NS34773, NS05820, NS045676, NS054147 e American Heart Association grant 0725314B (Principal Investigator: Dr. David Della Morte).

Un particolare ringraziamento ai Proff. Franco Rengo, Pasquale Abete, Miguel A. Perez-Pinzon, Ralph L. Sacco e Tatjana Rundek, miei mentore e miei maestri di vita durante questi anni di studio.

Un ringraziamento di vero cuore alla donna che mi e' stata vicino durante questi anni e che ha permesso tutto questo.

BIBLIOGRAFIA

- Arsenijevic D, Onuma H, Pecqueur C, Raimbault S, Manning BS, Miroux B, Couplan E, Alves-Guerra MC, Goubern M, Surwit R, Bouillaud F, Richard D, Collins S, Ricquier D (2000) Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat Genet* 26:435-439.
- Bodyak N, Rigor DL, Chen YS, Han Y, Bisping E, Pu WT, Kang PM (2007) Uncoupling protein 2 modulates cell viability in adult rat cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293:829-835.
- Bordone L, Motta MC, Picard F, Robinson A, Jhala US, Apfeld J, McDonagh T, Lemieux M, McBurney M, Szilvasi A, Easlson EJ, Lin SJ Guarente L (2006) Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic beta cells. *PLoS Biol* 4:e31.
- Borra MT, Smith BC, Denu JM (2005) Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol. *J Biol Chem* 280:17187-17195.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Brand MD, Esteves TC (2005) Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metab* 2:85-93.
- Chance B, Williams G (1956) The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv Enzymol* 17:65-134.
- Dave KR, DeFazio RA, Raval AP, Torraco A, Saul I, Barrientos A, Perez-Pinzon MA (2008) Ischemic preconditioning targets the respiration of synaptic mitochondria via protein kinase Cepsilon. *J Neurosci* 28:4172-4182.

- Dave KR, Raval AP, Prado R, Katz LM, Sick TJ, Ginsberg MD, Busto R, Perez-Pinzon MA (2004) Mild cardiopulmonary arrest promotes synaptic dysfunction in rat hippocampus. *Brain Res* 1024:89-96.
- de Bilbao F, Arsenijevic D, Vallet P, Hjelle OP, Ottersen OP, Bouras C, Raffin Y, Abou K, Langhans W, Collins S, Plamondon J, Alves-Guerra MC, Haguenaer A, Garcia I, Richard D, Ricquier D, Giannakopoulos P (2004) Resistance to cerebral ischemic injury in UCP2 knockout mice: evidence for a role of UCP2 as a regulator of mitochondrial glutathione levels. *J Neurochem* 89:1283-1292.
- Deierborg Olsson T, Wieloch T, Diano S, Warden CH, Horvath TL, Mattiasson G (2008) Overexpression of UCP2 protects thalamic neurons following global ischemia in the mouse. *J Cereb Blood Flow Metab* 28:1186-95.
- Dirnagl U, Simon RP, Hallenbeck JM (2003) Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci* 26:248-254.
- Esteves TC, Brand MD (2005) The reactions catalysed by the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Biochim Biophys Acta* 1709:35-44.
- Evans ZP, Ellett JD, Schmidt MG, Schnellmann RG, Chavin KD (2007) Mitochondrial uncoupling protein-2 mediates steatotic liver injury following ischemia/reperfusion. *J Biol Chem* 283:8573-9.
- Gidday JM (2006) Cerebral preconditioning and ischaemic tolerance. *Nat Rev Neurosci* 7:437-448.
- Grozinger CM, Chao ED, Blackwell HE, Moazed D, Schreiber SL (2001) Identification of a class of small molecule inhibitors of the sirtuin family of NAD-dependent deacetylases by phenotypic screening. *J Biol Chem* 276:38837-38843.

- Hao HD, He LR (2004) Mechanisms of cardiovascular protection by resveratrol. *J Med Food* 7:290-298.
- Hofhaus G, Shakeley RM, Attardi G (1996) Use of polarography to detect respiration defects in cell cultures. *Methods Enzymol* 264:476-483.
- Krause GS, Kumar K, White BC, Aust SD, Wiegenstein JG (1986) Ischemia, resuscitation, and reperfusion: mechanisms of tissue injury and prospects for protection. *Am Heart J* 111:768-780.
- Lee CP, SMPP (1993) Intact rat brain mitochondria from a single animal: preparation and properties. *Methods Toxicol* 2:41-50.
- Lee FY, Li Y, Zhu H, Yang S, Lin HZ, Trush M, Diehl AM (1999) Tumor necrosis factor increases mitochondrial oxidant production and induces expression of uncoupling protein-2 in the regenerating mice [correction of rat] liver. *Hepatology* 29:677-687.
- Mattiasson G, Shamloo M, Gido G, Mathi K, Tomasevic G, Yi S, Warden CH, Castilho RF, Melcher T, Gonzalez-Zulueta M, Nikolich K, Wieloch T (2003) Uncoupling protein-2 prevents neuronal death and diminishes brain dysfunction after stroke and brain trauma. *Nat Med* 9:1062-1068.
- McLeod CJ, Aziz A, Hoyt RF Jr, McCoy JP Jr, Sack MN (2005) Uncoupling proteins 2 and 3 function in concert to augment tolerance to cardiac ischemia. *J Biol Chem* 280:33470-33476.
- Michan S, Sinclair D (2007) Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J* 404:1-13.
- Mills EM, Xu D, Fergusson MM, Combs CA, Xu Y, Finkel T (2002) Regulation of cellular oncosis by uncoupling protein 2. *J Biol Chem* 277:27385-27392.
- Moynihan KA, Grimm AA, Plueger MM, Bernal-Mizrachi E, Ford E, Cras-Meneur C, Permutt MA, Imai S (2005) Increased dosage of mammalian Sir2 in

- pancreatic beta cells enhances glucose-stimulated insulin secretion in mice. *Cell Metab* 2:105-117.
- Pecqueur C, Alves-Guerra MC, Gelly C, Levi-Meyrueis C, Couplan E, Collins S, Ricquier D, Bouillaud F, Miroux B (2001) Uncoupling protein 2, in vivo distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation. *J Biol Chem* 276:8705-8712.
- Perez-Pinzon MA, Dave KR, Raval AP (2005) Role of reactive oxygen species and protein kinase C in ischemic tolerance in the brain. *Antioxid Redox Signal* 7:1150-1157.
- Perez-Pinzon MA, Xu GP, Dietrich WD, Rosenthal M, Sick TJ (1997) Rapid preconditioning protects rats against ischemic neuronal damage after 3 but not 7 days of reperfusion following global cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:175-182.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30:e36.
- Raval A, Lin H, Dave K, DeFazio A, Della Morte D, Kim E, Perez-Pinzon M (2008) Resveratrol and ischemic preconditioning in the brain. *Curr Med Chem* 15:1545-5.
- Raval AP, Dave KR, Perez-Pinzon MA (2006) Resveratrol mimics ischemic preconditioning in the brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:1141-1147.
- Rousset S, Mozo J, Dujardin G, Emre Y, Masscheleyn S, Ricquier D, Cassard-Doulcier AM (2007) UCP2 is a mitochondrial transporter with an unusual very short half-life. *FEBS Lett* 581:479-482.
- Scheffler I (1999) *Mitochondria*. A John Wiley & Sons, Inc., Publication, New York.

- Trenker M, Malli R, Fertschai I, Levak-Frank S, Graier WF (2007) Uncoupling proteins 2 and 3 are fundamental for mitochondrial Ca²⁺ uniport. *Nat Cell Biol* 9:445-452.
- Yenari M, Kitagawa K, Lyden P, Perez-Pinzon M (2008) Metabolic Downregulation. A Key to Successful Neuroprotection? *Stroke* 39:2910-7.
- Zhang F, Signore A P, Zhou Z, Wang S, Cao G, Chen J (2006) Erythropoietin protects CA1 neurons against global cerebral ischemia in rat: potential signaling mechanisms. *J Neurosci Res* 83:1241-1251.

Tabella 1. Parametri fisiologici

Gruppi	Parametri	IP		AC	
		Prima	Dopo	Prima	10 min dopo
Sham AC (n = 6)	Peso Corporeo				312 ± 30
	pH			7.45 ± 0.01	
	pCO ₂ mm Hg			37.14 ± 1.32	
	pO ₂ mm Hg			123.7 ± 7.29	
Veicolo + AC (n = 10)	Glicemia mg/dl				119 ± 15
	Peso Corporeo				315 ± 14
	pH			7.46 ± 0.009	7.4 ± 0.02
	pCO ₂ mm Hg			35.37 ± 1.39	32.07 ± 0.61
Mortalità 23%	pO ₂ mm Hg			125.4 ± 9.06	275.58 ± 53.55*
	Glicemia mg/dl				117 ± 14.
IPC + ACA (n = 6)	Peso Corporeo		315 ± 14		300 ± 12
	pH	7.43 ± 0.07	7.42 ± 0.5	7.43 ± 0.02	7.42 ± 0.02
	pCO ₂ mm Hg	41 ± 5	39 ± 1	39 ± 1	38 ± 1
	pO ₂ mm Hg	117 ± 7	115 ± 7	124 ± 7	316 ± 114*
Resveratrolo 100 mg/Kg + AC (n = 8)	Glicemia mg/dl		155 ± 26		109 ± 10
	Peso Corporeo				297 ± 21
	pH			7.48 ± 0.08	7.39 ± 0.01
	pCO ₂ mm Hg			36.6 ± 1.17	34.3 ± 1.6
Mortalità 20%	pO ₂ mm Hg			136.3 ± 10	338 ± 66*
	Glicemia mg/dl				111 ± 12
Resveratrolo 50 mg/Kg + AC (n = 8)	Peso Corporeo				305 ± 10
	pH			7.45 ± 0.01	7.37 ± 0.02
	pCO ₂ mm Hg			35.4 ± 0.8	33.3 ± 1.6
	pO ₂ mm Hg			130.9 ± 6.31	262.48 ± 58*
Mortalità 18%	Glicemia mg/dl				112 ± 17
	Peso Corporeo				311 ± 14
	pH			7.45 ± 0.01	7.43 ± 0.01
	pCO ₂ mm Hg			35.8 ± 0.9	32.6 ± 2
Mortalità 20%	pO ₂ mm Hg			131 ± 8.2	273.5 ± 25.7*
	Glicemia mg/dl				119 ± 14
DMSO ICV + AC (n = 5)	Peso Corporeo				307 ± 38
	pH			7.44 ± 0.03	7.39 ± 0.07
	pCO ₂ mm Hg			36.9 ± 2.5	33.43 ± 5.6
	pO ₂ mm Hg			131.1 ± 31.9	368.4 ± 57.3*
Mortalità 25%	Glicemia mg/dl				118 ± 38.1
	Peso Corporeo				305 ± 13
	pH			7.46 ± 0.11	7.41 ± 0.16
	pCO ₂ mm Hg			38.9 ± 1.7	37.3 ± 2.1
Mortalità 23%	pO ₂ mm Hg			148.7 ± 29.1	284.4 ± 26.9*
	Glicemia mg/dl				121 ± 19
Resveratrolo 10 mg/Kg + DMSO ICV + AC (n = 5)	Peso Corporeo				299 ± 12
	pH			7.48 ± 0.01	7.39 ± 0.06
	pCO ₂ mm Hg			35.3 ± 1.7	36.3 ± 1.1
	pO ₂ mm Hg			150.9 ± 26.12	224.5 ± 16.4*
Mortalità 20%	Glicemia mg/dl				115 ± 15
Resveratrolo 10 mg/Kg + sirtinolo ICV + AC (n = 5)	Peso Corporeo				302 ± 14.8
	pH			7.47 ± 0.01	7.42 ± 0.008
	pCO ₂ mm Hg			36.7 ± 0.6	34.7 ± 1.01
	pO ₂ mm Hg			134.8 ± 14	313 ± 77.5*
Mortalità 17%	Glicemia mg/dl				112 ± 19

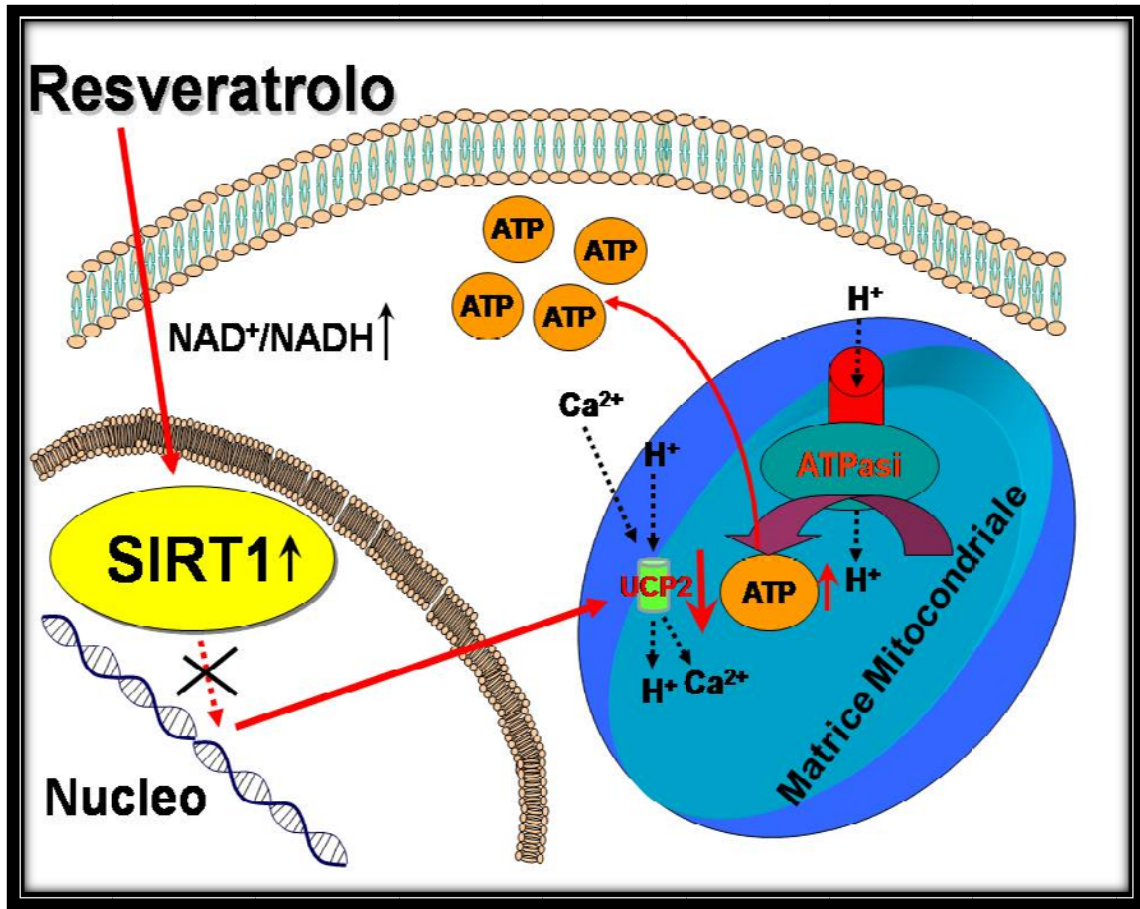


Figura 1. Schema diagrammatico delle vie molecolari attivate dal resveratrolo. Il resveratrolo induce l'attivazione di SIRT1 che a sua volta riduce i livelli della UCP2 nei mitocondri. Un ridotto livello della UCP2 e' collegato ad un incremento della produzione di ATP mitocondriale.

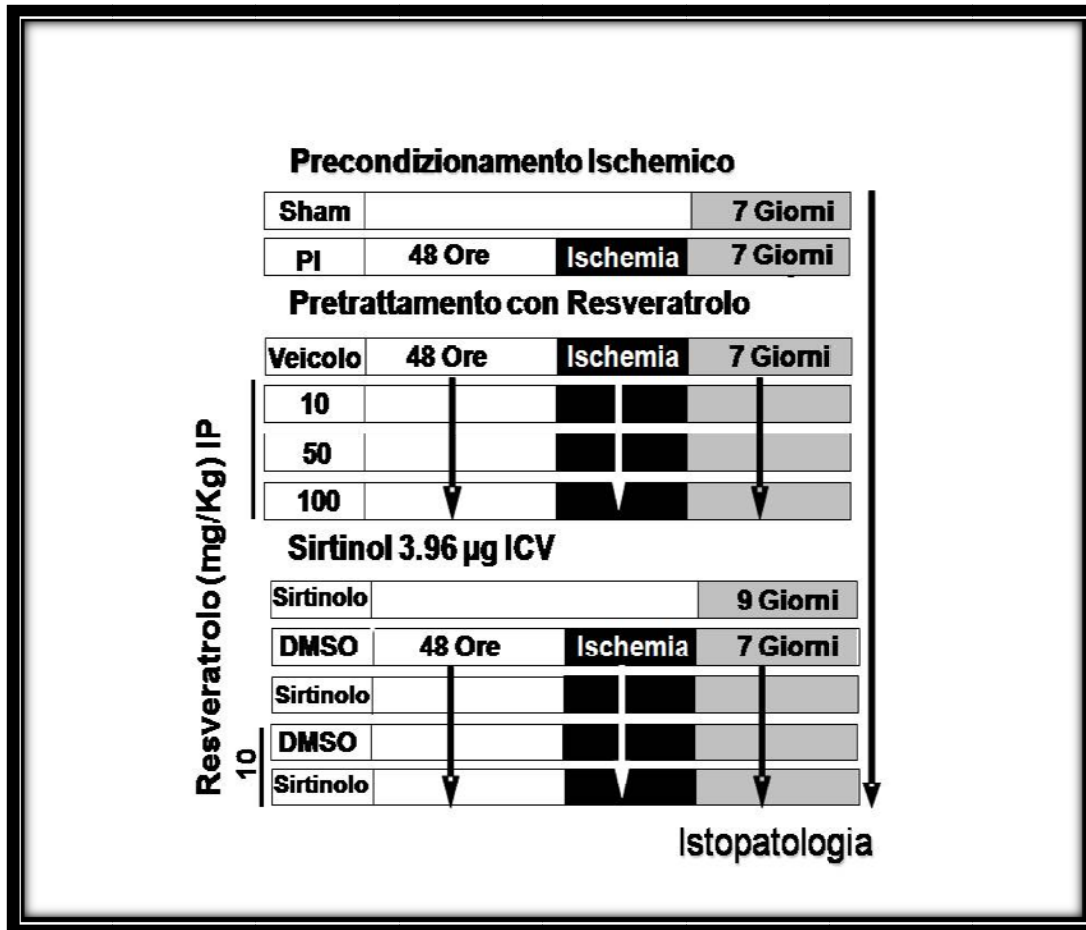


Figura 2. Disegno Sperimentale

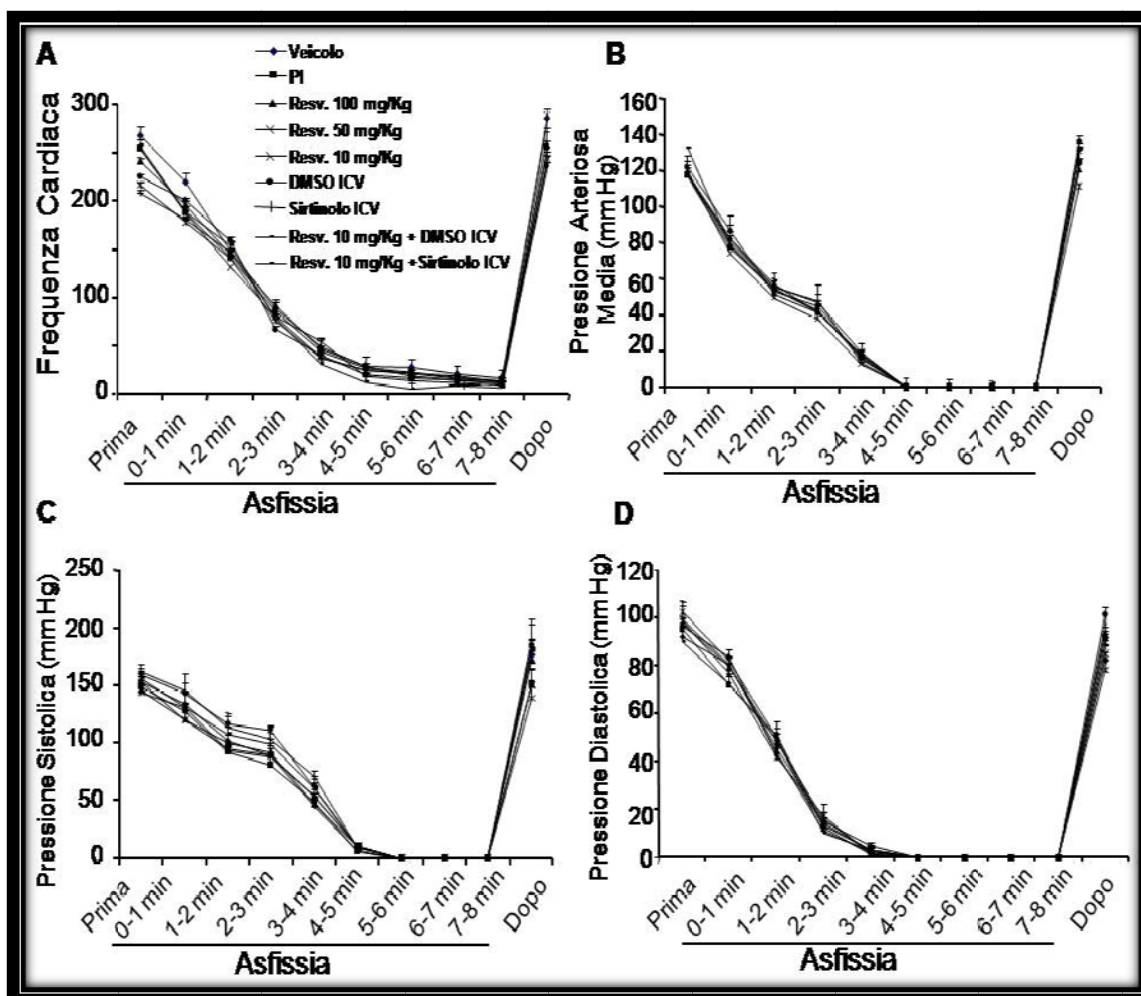


Figura 3. (A) Frequenza Cardiaca, (B) Pressione arteriosa media, (C) sistolica, e (D) diastolica prima, durante e dopo l'arresto cardiaco (AC). Nessuna differenza statisticamente significativa era presente tra i differenti gruppi. L'induzione dell'asfissia era seguita immediatamente da ipotensione sino a 50 mmHg e da severa bradicardia in ogni gruppo studiato. Entro i 3 – 4 minuti dall'induzione dello stato asfittico, la pressione arteriosa media diminuiva sino a 0 mmHg e la frequenza cardiaca sino a <20 Battiti per Minuto. Le pressioni sistolica e diastolica e la frequenza cardiaca diminuivano simultaneamente in ogni gruppo di animali sottoposti ad AC (Figure A, C e D). Durante la fase di rianimazione, la pressione arteriosa media ritornava a 60 mmHg entro 2 minuti in tutti i gruppi (Figura B).

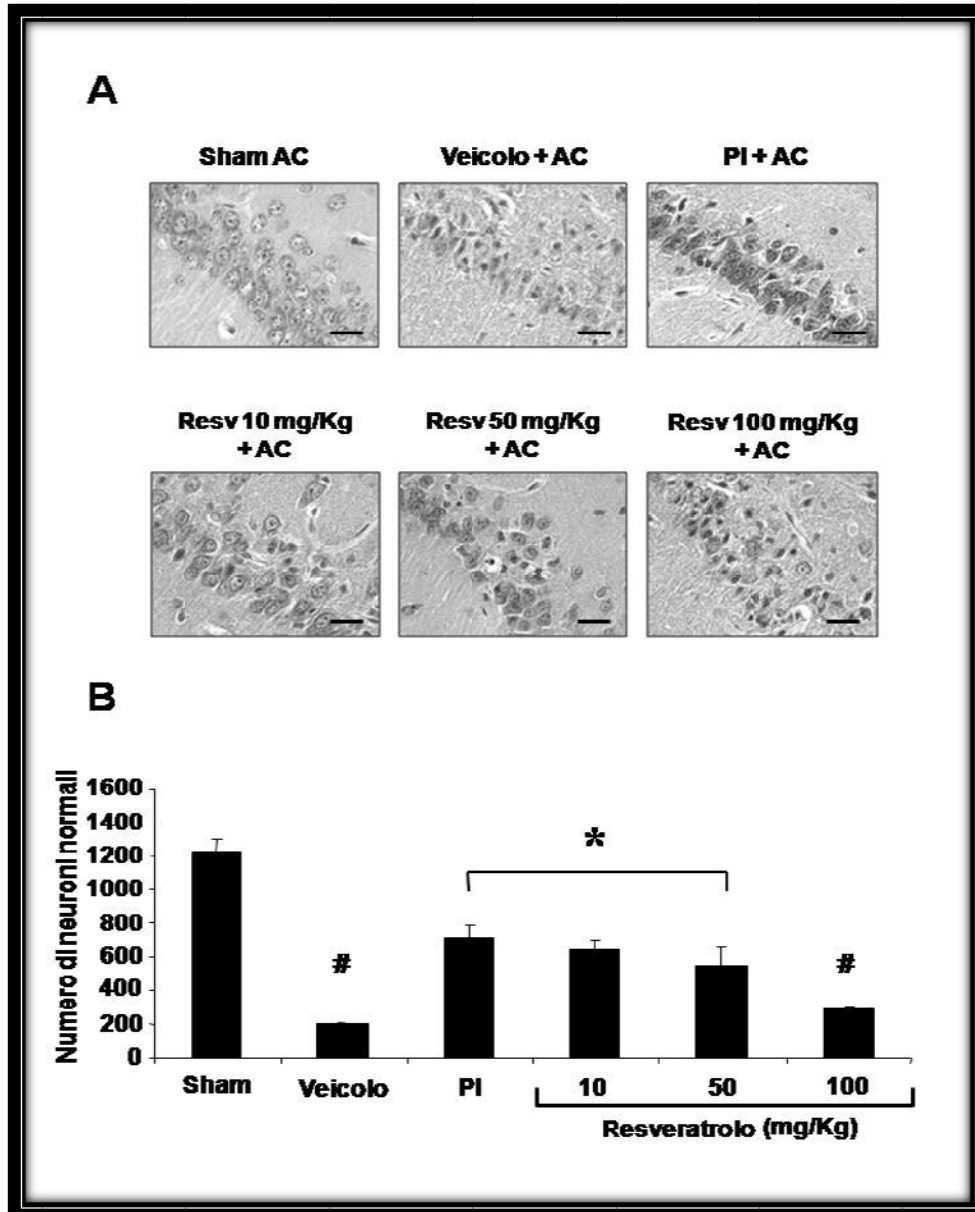


Figura 4. Il pretrattamento *in vivo* con resveratrolo mima il Precondizionamento Ischemico nella regione CA1 dell'Ippocampo. (A) Immagini rappresentative dell'analisi istologica e (B) numero di neuroni normali presenti nella regione CA1 dell'Ippocampo. Scala 30 μ m. $P < 0.05$ se paragonato ai gruppi trattati con veicolo e resveratrolo 100 mg/Kg di peso corporeo. $\#P < 0.05$ se paragonato ai gruppi PI; 10, e 50 mg/Kg di resveratrolo.

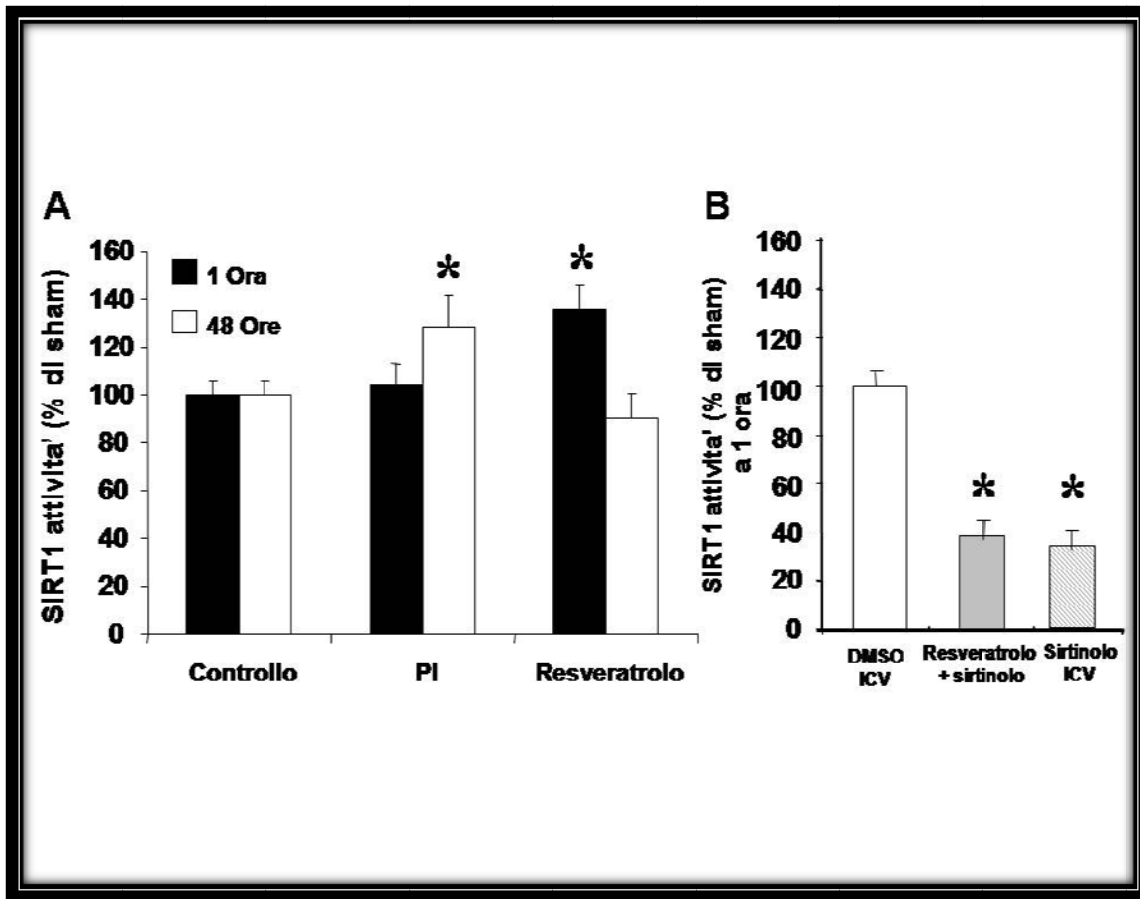


Figura 5. L'attivit  di SIRT1 aumenta nell'Ippocampo di ratto dopo PI e trattamento con resveratrolo. L'iniezioni intracerebroventricolare (ICV) di sirtinol blocca l'attivazione di SIRT1 successiva al pretrattamento con resveratrolo. (A) Attivit  enzimatica di SIRT1 misurata nell'Ippocampo di ratto 1 ora e 48 ore dopo induzione del PI e dopo pretrattamento con 10 mg/Kg di peso corporeo di resveratrolo. $P < 0.02$ se paragonato al gruppo sham. (B) Attivit  enzimatica di SIRT1 misurata nell'Ippocampo di ratto 1 ora dopo trattamento con DMSO ICV, 10 mg/Kg di resveratrolo + sirtinol ICV, e sirtinol ICV da solo. $P < 0.02$ se paragonato al gruppo controllo.

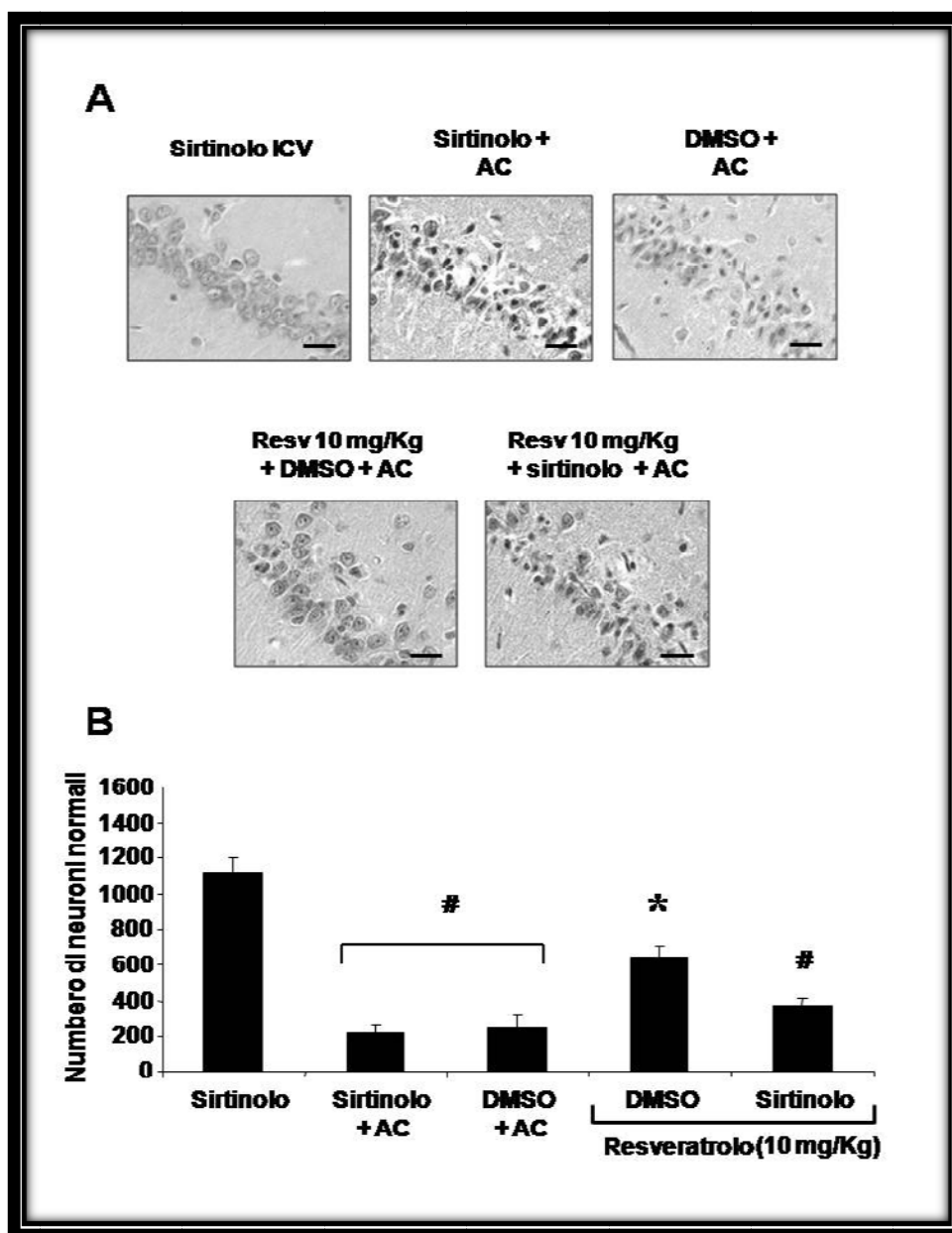


Figura 6. Il sirtinolo blocca la neuroprotezione indotta dal resveratrolo. (A) Immagini rappresentative dell'analisi istologica e (B) numero di neuroni normali presenti nella regione CA1 dell'Ippocampo. Scala 30 μ m. $P < 0.05$ se paragonato ai gruppi trattati con sirtinolo + AC, DMSO + AC e resveratrolo 10 mg/Kg + sirtinolo. $^{\#}P < 0.05$ se paragonato ai gruppi trattati con sirtinolo ICV e resveratrolo 10 mg/Kg + DMSO.

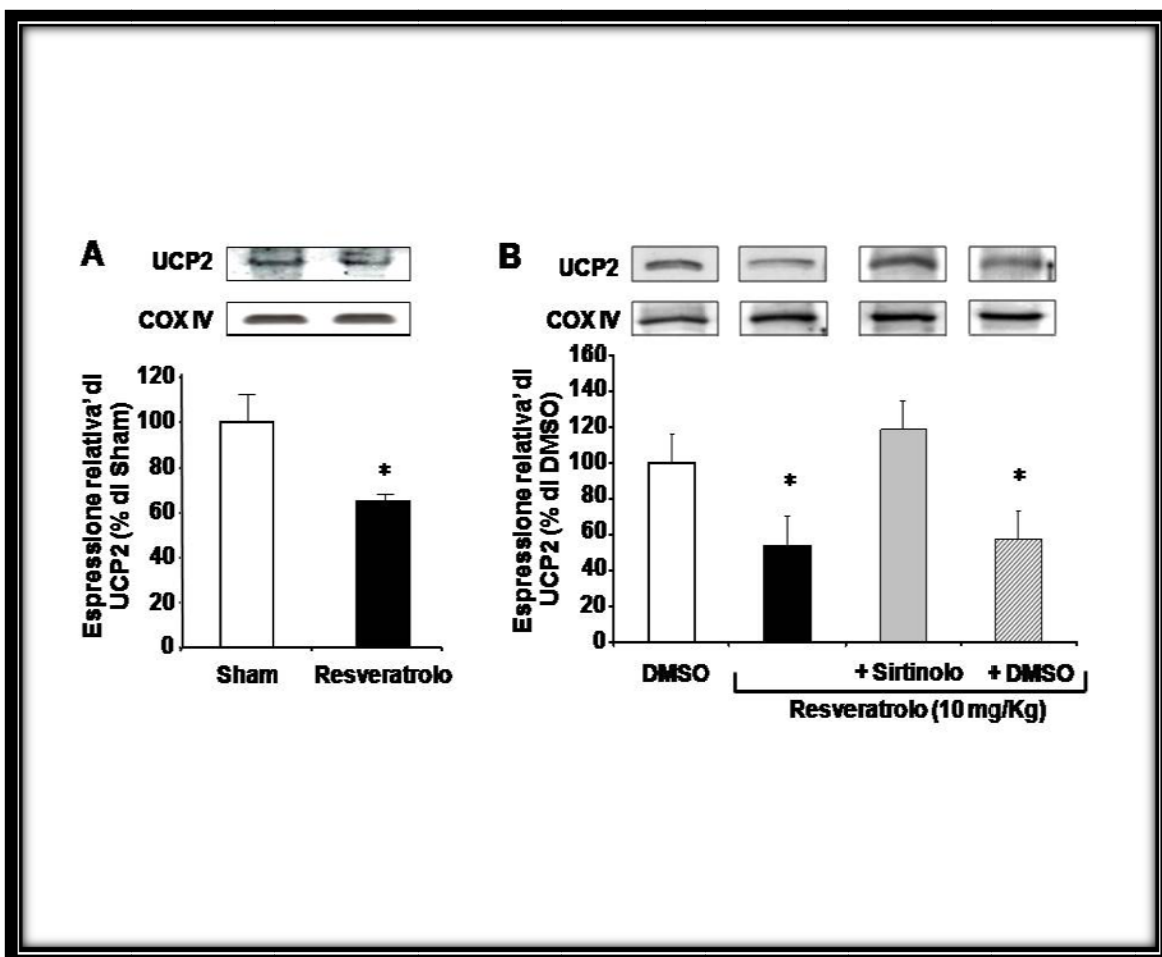


Figura 7. Il pretrattamento con resveratrolo diminuisce i livelli della UCP2 nei mitocondri isolati dall'Ippocampo di ratto. (A) I livelli della UCP2 misurati nei mitocondri isolati dall'Ippocampo del cervello di ratto dopo 48 ore dal trattamento con veicolo e con resveratrolo (10 mg/Kg). (B) Il sirtinolo blocca la capacità del resveratrolo di ridurre i livelli della UCP2. Sono stati utilizzati i seguenti trattamenti: resveratrolo (10 mg/Kg) + iniezione ICV di DMSO (veicolo per il sirtinolo) e resveratrolo (10 mg/Kg) + 3.94 µg di sirtinolo ICV. $P < 0.02$ se paragonato con il gruppo sham.

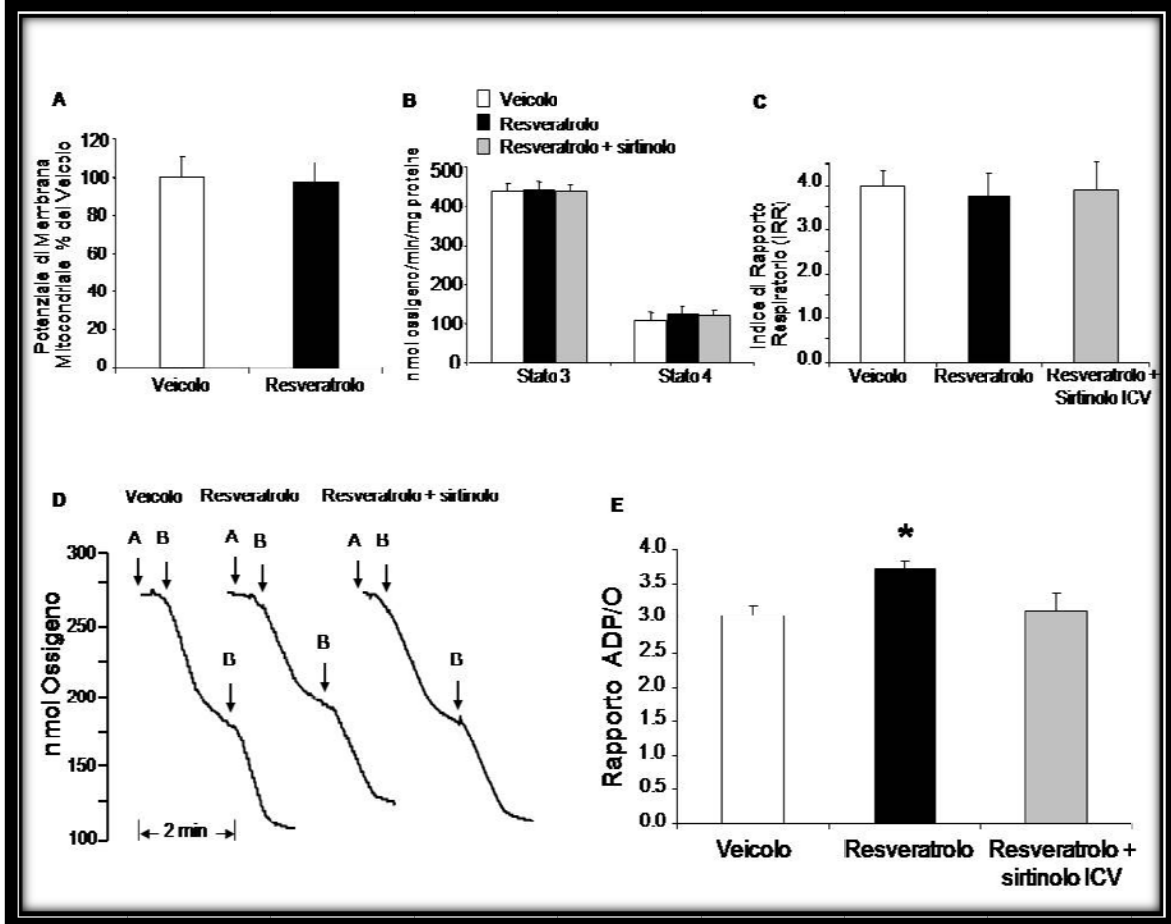


Figura 8. Effetto del pretrattamento con resveratrolo nella fisiologia mitocondriale. (A) $\Delta\Psi_m$, (B) stato 3 e 4 del tasso respiratorio, (C) indice di coefficiente respiratorio (ICR), (D) tipiche tracce polarografiche. Le frecce A e B indicano rispettivamente l'aggiunta del piruvato + malato, e dell'adenosina difosfato. (E) Rapporto ADP/O (indice del rapporto di sintesi dell'ATP e del consumo di ossigeno) misurato nei mitocondri isolati dall'Ippocampo di ratto a 48 ore dal trattamento con resveratrolo (10 mg/Kg), veicolo e resveratrolo (10 mg/Kg) + sirtinolo ICV. $P < 0.02$ se paragonato con il gruppo veicolo e $P < 0.05$ se paragonato con il gruppo resveratrolo (10 mg/Kg) + sirtinolo ICV.