SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA SPERIMENTALE

PRESENTAZIONE DEI CANDIDATI ALL'ESAME FINALE
XXVIII CICLO

Dott.ssa Chiara Zerbinati

La Dott.ssa Chiara Zerbinati, durante il corso di Dottorato in Medicina Sperimentale, ha svolto la sua attività di ricerca presso il laboratorio di Biologia Vascolare, Aterotrombosi e Spettrometria di massa del Dipartimento di Scienze e Biotecnologie Medico-Chirurgiche polo Pontino, Sapienza Università di Roma, sotto la direzione del Prof. Luigi Iuliano.

Nel corso del Dottorato, la Dott.ssa Zerbinati si è occupata dello studio degli ossisteroli, sia in relazione ad alcuni meccanismi implicati nel trattamento del tumore mammario sia del loro ruolo nella fisiopatologia dell'infertilità maschile.
Gli ossisteroli sono prodotti ossidati del colesterolo e possono essere generati sia da reazioni enzimatiche, mediate dalla famiglia di enzimi Citocromo P450 (CYP450), sia da reazioni non enzimatiche, che coinvolgono specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto (ROS/RNS).
Lo studio sugli ossisteroli e il tumore mammario è stato svolto in collaborazione con il Cancer Research Center di Tolosa (CRCT) del Prof. Marc Poirot. Il gruppo del Prof. Poirot ha identificato la Colesterolo Epossido Idrolasi (ChEH) come target per il Tamoxifene (Tam) e i ligandi AEBS (microsomal antiestrogen binding site). Il Tam è uno dei farmaci maggiormente utilizzati per la terapia ormonale nei tumori mammari positivi per i recettori dell'estrogeno (ER+); esso viene usato sia come adiuvante nel trattamento della neoplasia per prevenire recidive sia come terapia per estendere la vita di pazienti con patologie metastatiche. Il TAM, oltre ad essere un modulatore selettivo del recettore per l'estrogeno, mostra anche meccanismi antitumorali ER-indipendenti che coinvolgono il metabolismo ossidativo del colesterolo.
La ChEH è un complesso etero-oligomerico che trasforma il 5α,6α-epossicolesterolo e il 5β,6β-epossicolesterolo (EC), prodotti di autossidazione del colesterolo, nel colestane 3β,5α,6β-triolo (CT).
La Dott.ssa Zerbinati si è occupata di identificare e quantificare, grazie al metodo della diluizione isotopica in gas cromatografia-spettrometria di massa (GC-MS), i substrati e i prodotti della ChEH in cellule MCF-7 trattate con TAM.
E' stato osservato un aumento significativo del 5α,6α-EC e del 5β,6β-EC e l'assenza di un aumento del CT nelle cellule MCF-7 trattate con TAM rispetto alle cellule controllo; tale risultato dimostra che il TAM inibisce l'attività della ChEH, portando all'accumulo dei suoi substrati (ECs) e all'inibizione della produzione del CT. Inoltre, è stato individuato un nuovo ossisterolo che mostra un comportamento simile al CT, cioè una diminuzione significativa nelle cellule trattate rispetto alle

cellule di controllo. Questi dati indicano che, probabilmente, il CT è convertito in un metabolita sconosciuto che potrebbe agire potenzialmente come promotore tumorale. Questo metabolita è stato caratterizzato chimicamente, sempre utilizzando il GC-MS, ed identificato come 6-oxo-colestane-3β,5α-diolo (OCDO). Successivamente, la Dott.ssa Zerbinati ha studiato la stimolazione della biosintesi degli ossisteroli ROS-dipendente da parte del TAM, trattando le cellule MCF-7 con TAM in presenza e assenza dell'antiossidante Vitamina E. Si è visto che nelle cellule trattate con la Vitamina E la produzione dei 5,6-ECs viene completamente bloccata. Tutti questi risultati hanno portato a concludere che il TAM induce la produzione e l'accumulo dei 5,6-ECs attraverso un doppio meccanismo che coinvolge, da una parte, l'epossidazione del colesterolo mediata dai ROS e, dall'altra, l'inibizione della ChEH.
La comprensione dei complessi meccanismi, alla base dell'azione di questo farmaco, potranno aiutare nello sviluppo di nuovi SERMs o altri ligandi AEBS/ChEH nel trattamento del tumore mammario.
Partendo dai risultati ottenuti *in vitro* sul ruolo degli ossisteroli nella farmacologia del Tam, sempre in collaborazione con il CRCT, è stato effettuato uno studio pilota su pazienti con tumore mammario sottoposti a terapia con Tam o inibitori delle aromatasi (AI). Sono state determinate le concentrazioni di 12 ossisteroli nel plasma sanguigno di 29 pazienti prima e durante il trattamento con Tam o AI, in modo da poter studiare l'impatto del Tam o degli AI sul metabolismo degli ossisteroli *in vivo*.
I dati ottenuti in questo studio dimostrano che il metabolismo del colesterolo non è importante solo nella progressione del tumore mammario, ma anche sugli effetti farmacologici e terapeutici del Tam nei pazienti. Questi risultati sono importanti soprattutto per lo sviluppo di nuove combinazioni terapeutiche con un setting personalizzato per ogni singolo paziente. Per fare ciò è, infatti, indispensabile l'utilizzo di appropriati biomarkers plasmatici nei pazienti neoplastici.
Per quanto riguarda, invece, lo studio sulla fertilità maschile, la Dott.ssa Zerbinati ha collaborato con il Centro di Andrologia e Fisiopatologia delle Riproduzione (CAPR) dell'Ospedale SM Goretti di Latina.
Il colesterolo è uno dei principali componenti delle membrane lipidiche degli spermatozoi; il contenuto e la distribuzione di colesterolo sono essenziali per la fluidità di membrana, la capacitazione e la reazione acrosomiale e, quindi, per il raggiungimento di una piena capacità fecondativa. Inoltre, è stato visto che la capacitazione è un processo strettamente dipendente dalla formazione di ROS. Data l'abbondanza di colesterolo a livello delle membrane plasmatiche degli spermatozoi, e la sua suscettibilità all'autossidazione, la Dott.ssa Zerbinati ha identificato e quantificato, per la prima volta nel liquido seminale umano, i prodotti di ossidazione del colesterolo (ossisteroli) e studiato il loro eventuale coinvolgimento nei processi fisiologici e/o patologici che riguardano la fertilità maschile.
Lo studio ha incluso 134 pazienti suddivisi in 4 gruppi, in base ai parametri seminali in accordo con le linee guida della World Health Organization 2010 (WHO 2010): 33 Normozoospermici (NORMO); 25 Astenozoospermici (A); 32 Oligoastenoteratozoospermici (OAT); 44 Varicocele (V).
Per la prima volta sono stati identificati e quantificati 11 diversi ossisteroli nel liquido seminale umano. L'unico composto che ha mostrato variazioni significative tra i diversi gruppi è il 25-idrossicolesterolo (25-HC). La quantità di 25-HC è significativamente maggiore nel gruppo dei NORMO rispetto agli altri gruppi e questo risultato ha portato ad indagare sull'eventuale ruolo del 25-HC nella funzionalità degli spermatozoi e sulla fertilità maschile.
Il 25-HC viene formato dalla Colesterolo 25-Idrossilasi (Ch25H), un enzima che non appartiene alla famiglia CYP450, ma ad un piccolo gruppo di enzimi che usano come cofattore lo ione ferro per l'idrossilazione dei loro substrati. La Dott.ssa Zerbinati ha localizzato la Ch25H, con un saggio di immunofluorescenza, a livello della porzione post-acrosomiale e del colletto degli spermatozoi ed ha confermato la presenza dell'enzima con un saggio Western Blot.

In letteratura è riportato che il 25-HC è in grado di cambiare la posizione e l'orientamento del colesterolo nella membrana plasmatica, aumentando così la sua disponibilità ad accettori esterni. Un passaggio fondamentale perché lo spermatozoo sia in grado di penetrare la cellula uovo è la capacitazione, ed uno dei primi cambiamenti che si hanno in questa fase è la perdita di colesterolo dalla membrana plasmatica della cellula spermatica. Per verificare se effettivamente queste modificazioni potevano essere indotte dal 25-HC, gli spermatozoi sono stati incubati con un terreno capacitante (TC) (usato nella pratica clinica per capacitare gli spermatozoi per le tecniche di inseminazione e fecondazione in vitro), con un terreno non capacitante (TNC) (plasma seminale purificato per centrifugazione da tutte le cellule presenti) in presenza e assenza di 25-HC. E' stato poi eseguito, su 4 campioni differenti di spermatozoi, un test con la clorotetraciclina (CTC test), sostanza in grado di colorare in modo differente gli spermatozoi capacitati (con acrosoma che ha reagito) da quelli non capacitati (con acrosoma intatto). La percentuale di spermatozoi con acrosoma reagito nei campioni incubati con 25-HC è uguale a quella degli spermatozoi incubati con TC (controllo positivo), mentre risulta significativamente inferiore in quelli incubati con TNC (controllo negativo).
Alla luce di questi risultati si può affermare che il 25-HC agisce sugli spermatozoi umani come sostanza in grado di indurre reazione acrosomiale.

Concludendo, è possibile dire che, oltre ad aver identificato e quantificato 11 diversi ossisteroli nel liquido seminale umano, la Dott.ssa Zerbinati ha individuato una sostanza, il 25-HC, che potrebbe essere utilizzata come potenziale marker per identificare campioni seminali con parametri anormali. E' stata inoltre localizzata, per la prima volta negli spermatozoi umani, la Ch25H, in grado di indurre negli spermatozoi reazione acrosomiale. Si potrebbe ipotizzare che il mancato o ridotto funzionamento della Ch25H e, quindi una scarsa produzione di 25-HC, abbia un ruolo negli spermatozoi che non riescono a fecondare la cellula uovo (potrebbe spiegare le così dette infertilità idiopatiche). Quest'ultimo risultato è molto importante perché apre la strada ad ulteriori ricerche, soprattutto mirate alla comprensione del ruolo di questa sostanza nella fisiopatologia dell'infertilità maschile e all'applicazione in tecniche di fecondazione assistita.

PUBBLICAZIONI 2012-2015

Iuliano L, Pacelli A, Ciacciarelli M, **Zerbinati C**, Fagioli S, Piras F, Orfei MD, Bossù P, Pazzelli F, Serviddio G, Caltagirone C, Spalletta G. Plasma fatty acid lipidomics in amnestic mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis. 2013; 36(3):545-53.

Murdolo G, Piroddi M, Luchetti F, Tortoioli C, Canonico B, **Zerbinati C**, Galli F, Iuliano L. Oxidative stress and lipid peroxidation by-products at the crossroad between adipose organ dysregulation and obesity-linked insulin resistance. Biochimie 2013; 95(3):585-94.

Segala G, de Medina P, Iuliano L, **Zerbinati C**, Paillasse MR, Noguer E, Dalenc F, Payré B, Jordan VC, Record M, Silvente-Poirot S, Poirot M. 5,6-Epoxy-cholesterols contribute to the anticancer pharmacology of tamoxifen in breast cancer cells. Biochem Pharmacol. 2013; 86(1):175-89.

Gamba P, Guglielmotto M, Testa G, Monteleone, D, **Zerbinati C**, Gargiulo S, Biasi F, Iuliano L, Giaccone G, Mauro A, Poli G, Tamagno E, Leonarduzzi G. Up-regulation of β-amyloidogenesis in neuron-like human cells by both 24- and 27-hydroxycholesterol: protective effect of N-acetyl-cysteine. Aging Cell 2014; 13(3):561-72.

Ginanni Corradini S, **Zerbinati C**, Maldarelli F, Palmaccio G, Parlati L, Bottaccioli AG, Molinaro A, Poli E, Boaz M, Serviddio G, Mennini G, Corsi A, Bianco P, Rossi M, Iuliano L. Plasma fatty acid lipidome is associated with cirrhosis prognosis and graft damage in liver transplantation. Am J Clin Nutr 2014; 100(2):600-8.

Vurusaner B, Gamba P, Testa G, Gargiulo S, Biasi F, **Zerbinati C**, Iuliano L, Leonarduzzi G, Basaga H, Poli G. Survival signaling elicited by 27-hydroxycholesterol through the combined modulation of cellular redox state and ERK/Akt phosphorylation. Free Radic Biol Med. 2014; 77:376-85.

Tritapepe L., Iuliano L., Wang Y., Griffiths W.J., Clayton P.T., Morris A.A., Bigger B.W., **Zerbinati C**., Crick P.J., Bentley T.W., Abdel-Khalik J., Matthews I. Quantitative Charge-Tags for Sterol and Oxysterol Analysis. Clin Chem. 2015; 61(2):400-11.

Iuliano L, Crick PJ, **Zerbinati C**, Tritapepe L, Abdel-Khalik J, Poirot M, Wang Y, Griffiths WJ. Cholesterol metabolites exported from human brain. Steroids 2015; 99(Pt B):189-93.

Luchetti F, Canonico B, Cesarini E, Betti M, Galluzzi L, Galli L, Tippins J, **Zerbinati C**, Papa S, Iuliano L. 7-Ketocholesterol and 5,6-secosterol induce human endothelial cell dysfunction by differential mechanisms. Steroids. 2015; 99(Pt B):204-11.

Ciacciarelli M, **Zerbinati C**, Violi F, Iuliano L. Dipyridamole: A drug with unrecognized antioxidant activity. Curr Top Med Chem. 2015; 15(9):822-9.

Tremblay-Franco M, **Zerbinati C**, Pacelli A, Palmaccio G, Lubrano C, Ducheix S, Guillou H, Iuliano L. Effect of obesity and metabolic syndrome on plasma oxysterols and fatty acids in Human. Steroids 2015; 99(Pt B):287-92.

Zerbinati C, Galli F, Regolanti R, Poli G, Iuliano L. Gas chromatography-mass spectrometry microanalysis of alpha- and gamma-tocopherol in plasma and whole blood. Clin Chim Acta. 2015; 15;446:156-62.

Crick PJ, William Bentley T, Abdel-Khalik J, Matthews I, Clayton PT, Morris AA, Bigger BW, **Zerbinati C**, Tritapepe L, Iuliano L, Wang Y, Griffiths WJ. Quantitative charge-tags for sterol and oxysterol analysis. Clin Chem. 2015;61(2):400-11.

Il Collegio dei Docenti giudica l'attività scientifico-formativa della Dott.ssa **Chiara Zerbinati** in modo positivo, in base alla frequenza e all'attività di ricerca complessivamente svolta. Esprime parere favorevole alla presentazione di una tesi di Dottorato dal titolo:

THE OXYSTEROL NETWORK IN BIOLOGY AND MEDICINE

Il Segretario

Prof.ssa Patrizia Mancini

Il Coordinatore

Prof.ssa Maria Rosaria Torrisi