

Inizio con CIBM con lo studio bioattività delle macro alghe



Halopithys incurva

Dictyota dichotoma

- The effects of Tyrrhenian seaweed extracts on amyloid aggregation assessed by atomic force microscopy

Matteo Ramazzotti , Bruno Tiribilli, Francesca Niccheri and Donatella Degl'Innocenti

Annul Meeting of Marine and Environmental Biochemistry- BMA2010- SanBenedetto (AP) May 20-21, 2010

- Biochemical characterization of extracts from tyrrhenian seaweeds

Matteo Ramazzotti , Bruno Tiribilli, Francesca Niccheri and Donatella Degl'Innocenti

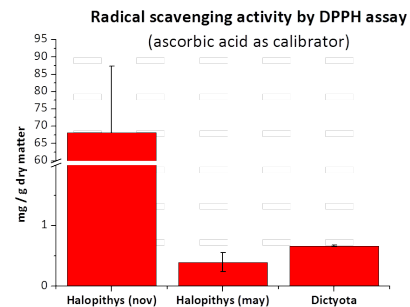
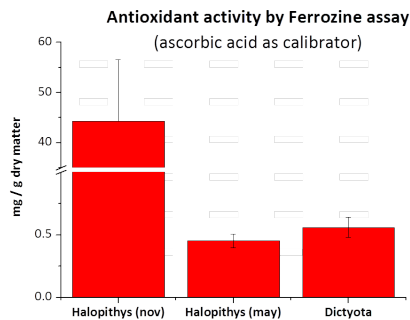
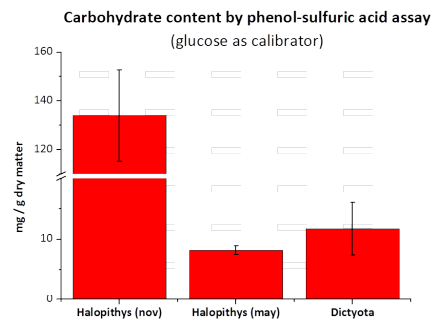
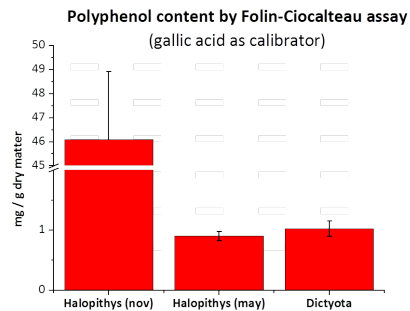
Annul Meeting of Marine and Environmental Biochemistry- BMA2010- SanBenedetto (AP) May 20-21, 2010

-Biochemical characterization of the Tyrrhenian seaweed Halopithys incurva

Ramazzotti Matteo, Niccheri Francesca, and Degl'Innocenti Donatella

"ISMAR Ecotoxicology Congres 2010", Livorno, October 20-22 2010

Caratterizzazione biochimica delle macro alghe



In this work we studied a panel of compound classes in extracts from two common seaweeds of the Tyrrhenian sea, namely *Dichtyota dichotoma* and *Halopythis incurva* (Rhodophyta). Samples were taken from the marine park of Meloria in May (Dichtyota, DM and Halopythis, HM) and November (Halopythis, HN) and, after drying in oven, they were pulverized and subject to water/ethanol extraction followed by defatting with n-hexane. Vacuum dried extracts were resuspended in water and used directly for the assays.

Taken together these results let us indicate marine seaweeds from Tuscany, especially *Halopythis incurva* in its autumnal cycle status, are feasible for further studies aimed at isolating possible polyphenolic compounds of therapeutic interest.



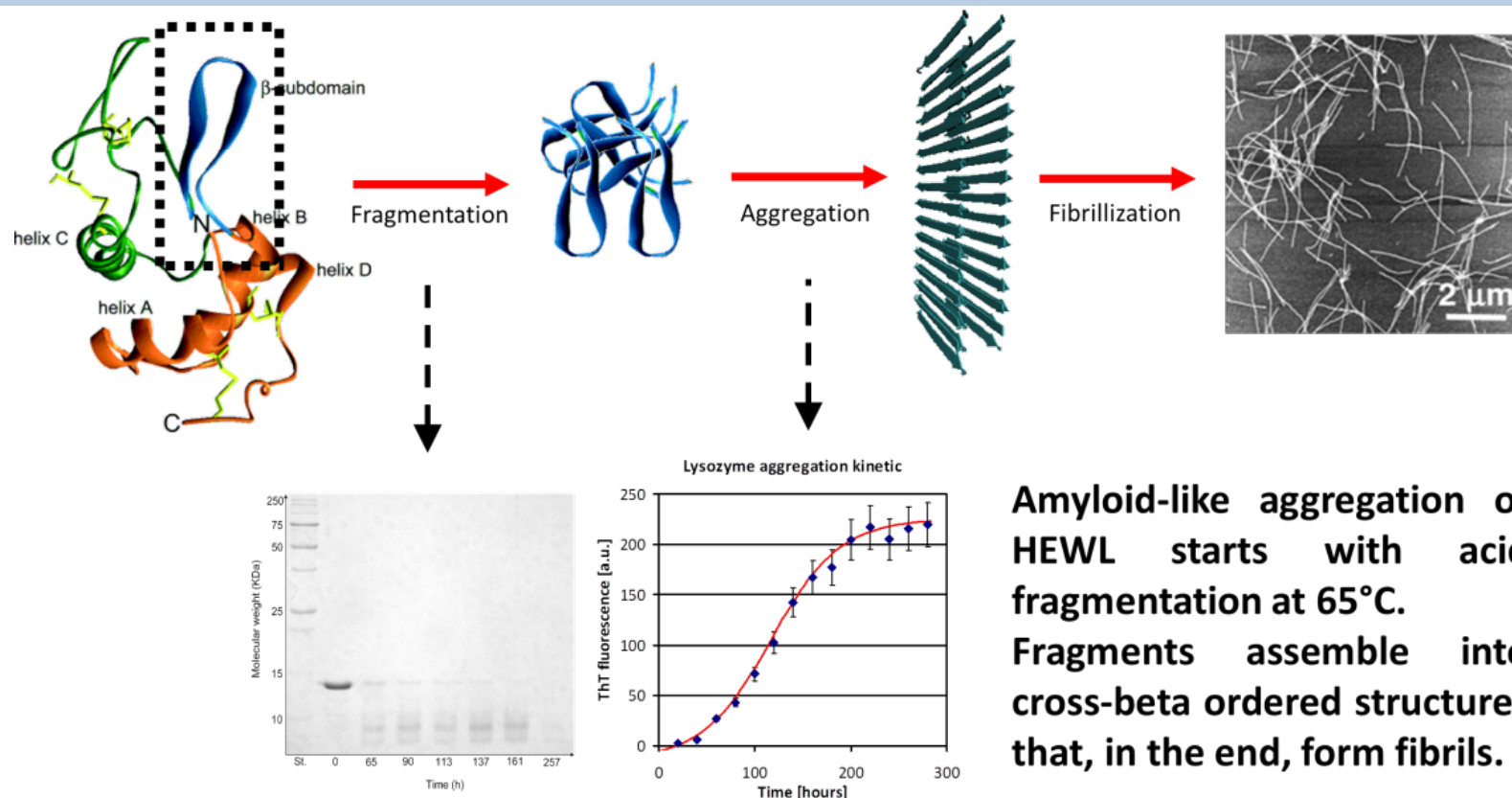
Acknowledgments

This work has been fully granted by **Fondazione Cassa di Risparmi di Livorno** 2009. The authors wish to thank **dr. Luigi Piazz** for identifying and collecting the seaweeds.

Le amiloidosi sono un gruppo di malattie causate dal deposito in vari tessuti di proteine anomale. In ciascun tipo di amiloidosi, una diversa proteina prodotta dall'organismo acquisisce la proprietà di accumularsi in diversi organi e tessuti sotto forma di fibrille.

I depositi formati da queste fibrille sono chiamati amiloide. Il progressivo accumulo dell'amiloide provoca un danno degli organi coinvolti e causa i sintomi della malattia

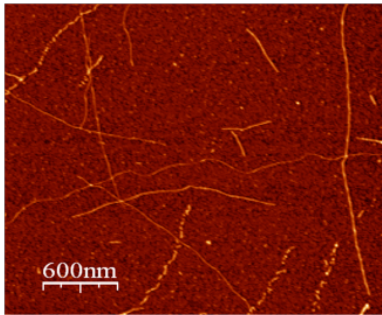
Si conoscono più di venti tipi di amiloidosi, ciascuno causato da una diversa proteina che forma le fibrille, tra queste ricordiamo il morbo di Alzheimer, morbo di Parkinson, diabete di tipo II, corea di Huntington e la polineuropatia amiloide familiare.



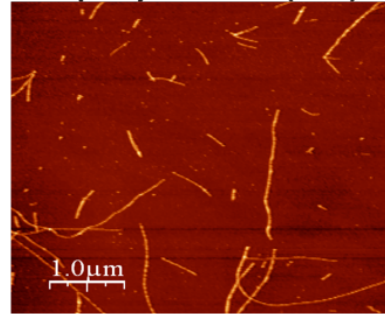
Amyloid-like aggregation of HEWL starts with acid fragmentation at 65°C. Fragments assemble into cross-beta ordered structures that, in the end, form fibrils.

Halopythis incurva di novembre rallentamento del processo di aggregazione

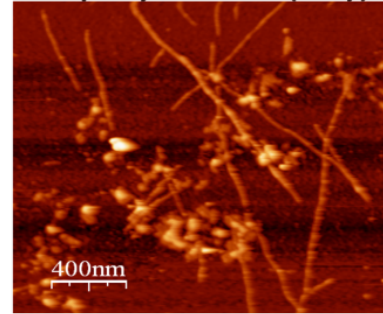
Lysozyme (HEWL)



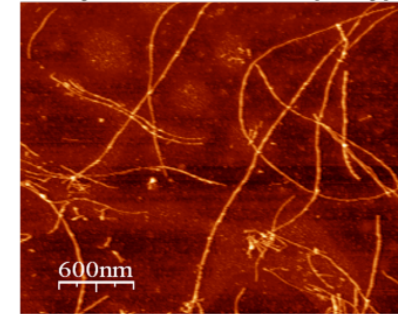
Halopythis incurva (nov)



Halopythis incurva (may)

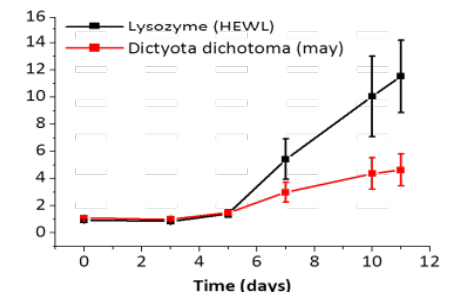
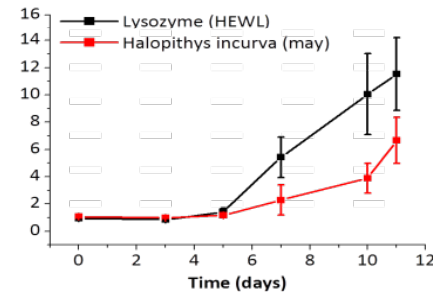
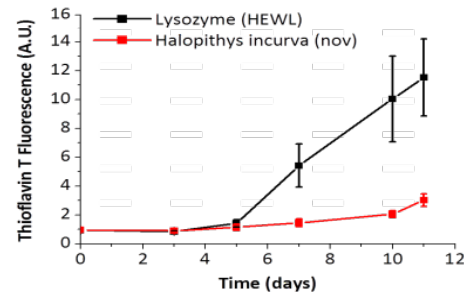


Dictyota dichotoma (may)



Top row: AFM images of HEWL after 10 days incubation with different extracts.

Bottom row: Aggregation kinetics followed by Thioflavin T fluorescence.



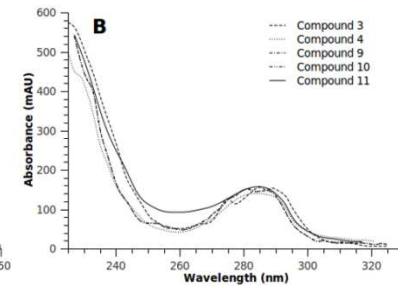
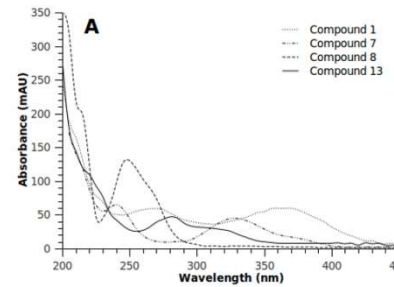
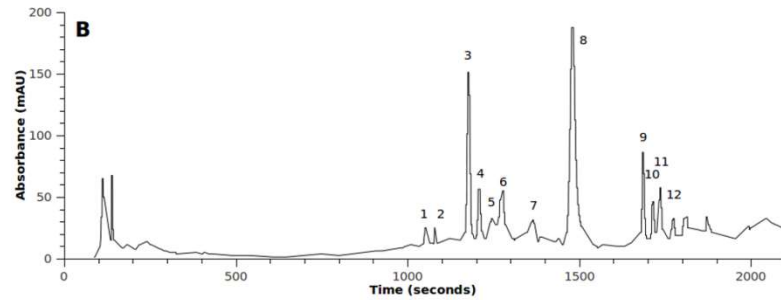
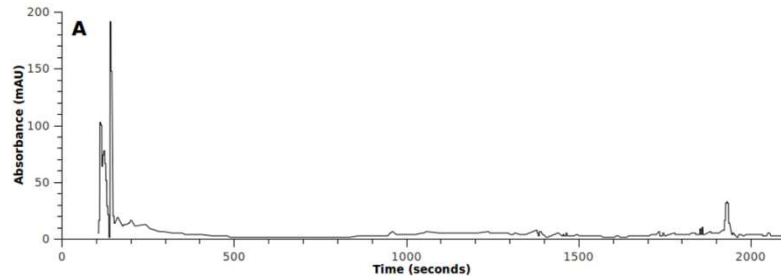
Extract	Inhibition %
<i>Halopythis incurva</i> (nov)	79.2 ± 8.2
<i>Halopythis incurva</i> (may)	72.9 ± 6.4
<i>Dictyota dichotoma</i> (may)	68.9 ± 4.1



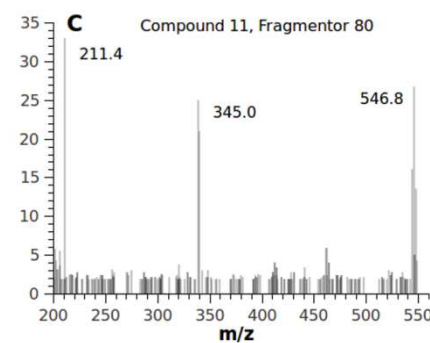
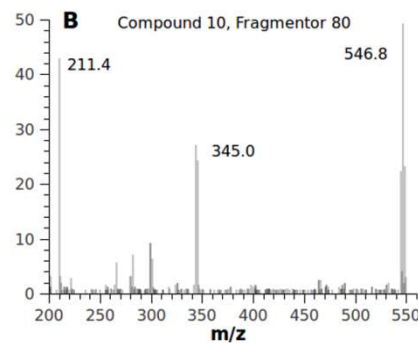
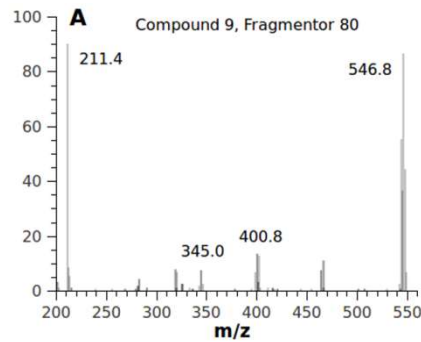
L'effetto protettivo osservato su cellule di neuroblastoma umano è dovuto ad una azione di interferenza sul processo di aggregazione proteica non ad un processo di citoprotezione

HPLC/DAD/MS analysis *Halopythis incurva* di Nov (A) e May (B)

UV-Vis spectra of phenolic compounds



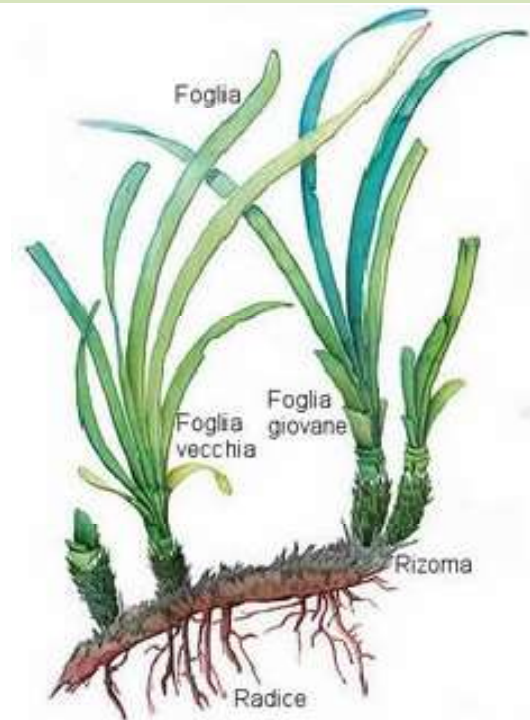
Mass spectra in negative ionization mode (fragmentor intensity 80 V) of some isobaric halogenophenols, namely compounds 9, 10 and 11 (chlorine / bromine atom) ????



La *Posidonia oceanica* (L.) Delile

è una fanerogama marina quindi una pianta superiore endemica del Mar Mediterraneo, in quanto si trova soltanto lungo le coste di questo bacino.

- La prateria di Posidonia costituisce l'ecosistema più complesso e importante del Mar Mediterraneo, ospitando al suo interno diversi organismi animali e vegetali e fungendo da bioindicatore dello stato di salute delle acque costiere.
- Sono poche le descrizioni della proprietà terapeutiche nella tradizione popolare .



Perché studiare la *Posidonia* ?

La pianta marina *Posidonia oceanica* rappresenta una fonte poco esplorata di prodotti naturali derivanti da processi metabolici e fisiologici caratteristici degli organismi marini, che si discostano da quelli ben più noti delle piante terrestri e il cui potenziale biologico è da considerarsi una sfida della moderna ricerca biomedica come fonte di nuovi modelli molecolari dotati di scarsa tossicità



dal naturale al sintetico : andata e ritorno

Preparazione degli estratti idroalcolici

- Dopo la raccolta le foglie di PO sono state private degli epifiti e sciacquate in acqua distillata, dopodiché sono state essiccate a 60 °C fino ad ottenere dei campioni sufficientemente disidratati per evitarne la degradazione.
- Come esempio di una estrazione possiamo considerare di partire da 4 gr di foglie essiccate, tritate e miscelate con 40 ml di etanolo 70%, mantenute in agitazione a temperatura ambiente overnight e portate poi per 3 h a 65°C.
- L'estratto è stato poi centrifugato
- Si è poi proceduto con una fase di estrazione organica con esano per rimuovere clorofille ed altri composti idrofobici che avrebbero interferito successivamente con i dosaggi biologici in ambiente acquoso. Si è miscelato in un imbuto separatore l'estratto con esano in rapporto 1:1, alternando agitazione, riposo e separazione delle fasi per 3 volte.
- Recuperata la fase idroalcolica inferiore
- Aliquotate in provette (1 ml) e portata a secco.



Caratterizzazione degli estratti

Table 1 Biochemical characterization of POE. Values represent the mean and the standard deviation of at least 4 independent extractions. Abbreviations: TC: total carbohydrate, TP: total polyphenols, RS: radical scavenging activity.

	Method	Fresh POE mg/mL	1 week POE mg/mL	Reference compound
Dry extract	Weighting	43.0 ± 0.5	43.0 ± 0.5	—
TC	Phenol-sulfuric acid	33.4 ± 10.8	31.0 ± 9.7	D-glucose
TP	Folin-Ciocalteu	7.4 ± 0.4	7.3 ± 0.5	Gallic acid
Antioxidant	FerroZine™	8.03 ± 0.34	8.20 ± 0.41	Ascorbic acid
RS	DPPH	6.01 ± 0.55	5.80 ± 0.62	Ascorbic acid

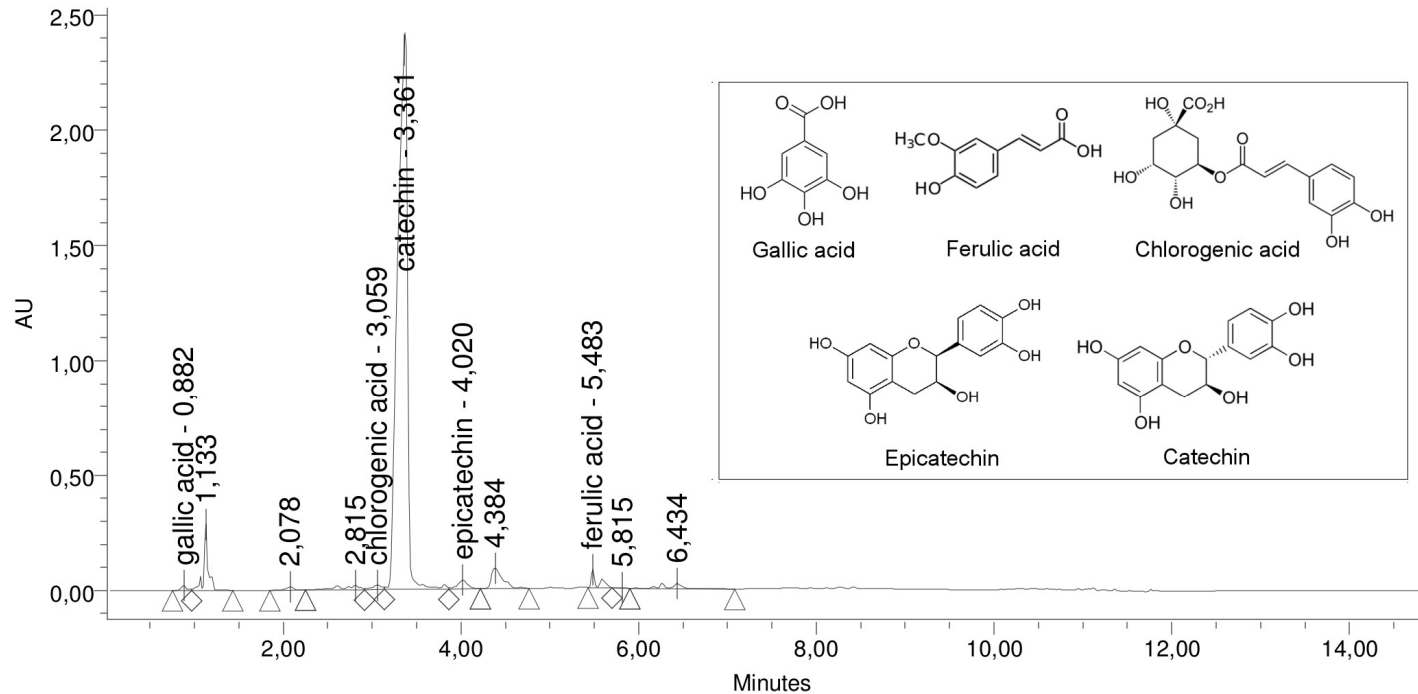
Table 2 Characterization of the polyphenolic component of POE by UPLC.

Phenol name*	Retention Time (min)	Area (%)	Concentration (µg/mL)**
Gallic acid	0.882	0.374	1.94 ± 0.78
NA	1.133	4.303	NA
NA	2.078	0.410	NA
NA	2.815	1.352	NA
Chlorogenic acid	3.059	0.639	8.46 ± 0.03
(+) Catechin	3.361	84.762	418.44 ± 9.00
Epicatechin	4.022	1.383	33.31 ± 0.60
NA	4.384	3.634	NA
Ferulic acid	5.483	1.729	10.68 ± 1.19
NA	5.815	0.043	NA
NA	6.434	1.371	NA

*NA indicates peaks with unknown attributions

**Concentrations are reported for known polyphenols only

Composizione estratti 20% non identificato

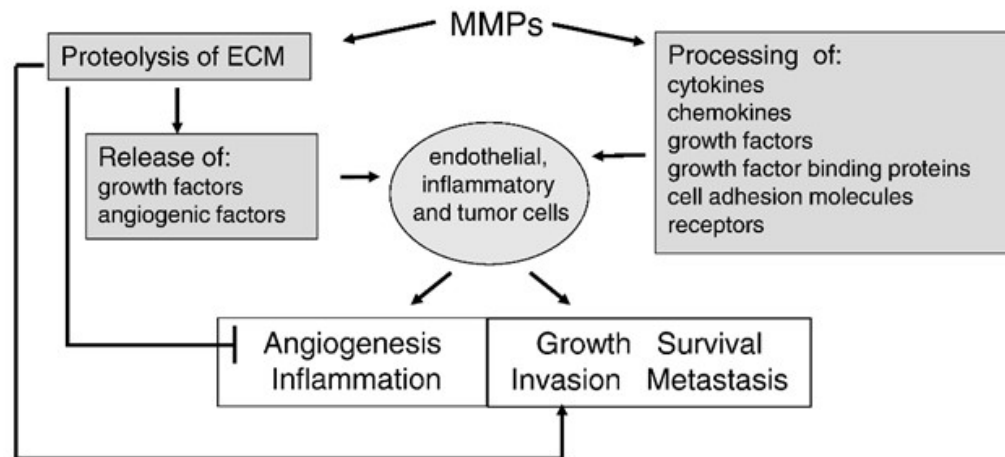
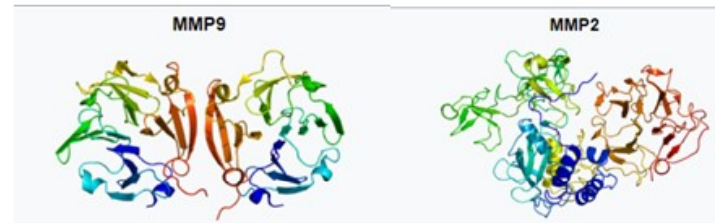


I risultati preliminari sulla azione biologica di Posidonia hanno messo in evidenza che gli estratti idro-alcologici contengono polifenoli e che la **bioattività è mantenuta di tutto l'estratto (POE).**

Hydrophilic extract from *Posidonia oceanica* inhibits activity and expression of gelatinases and prevents HT1080 human fibrosarcoma cell line invasion

Emanuela Barletta^{1,†}, Matteo Ramazzotti^{1,†}, Florinda Fratianni², Daniela Pessani^{3,4}, and Donatella Degl'Innocenti^{1,4,*}

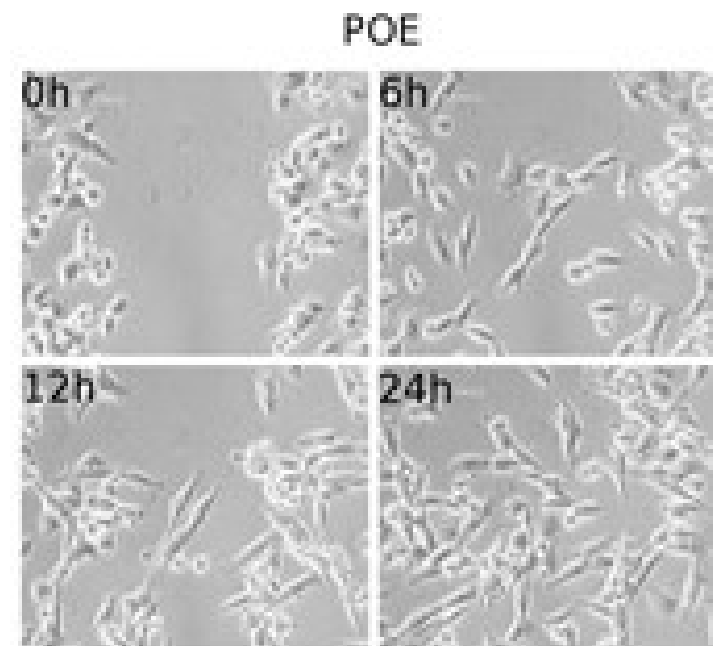
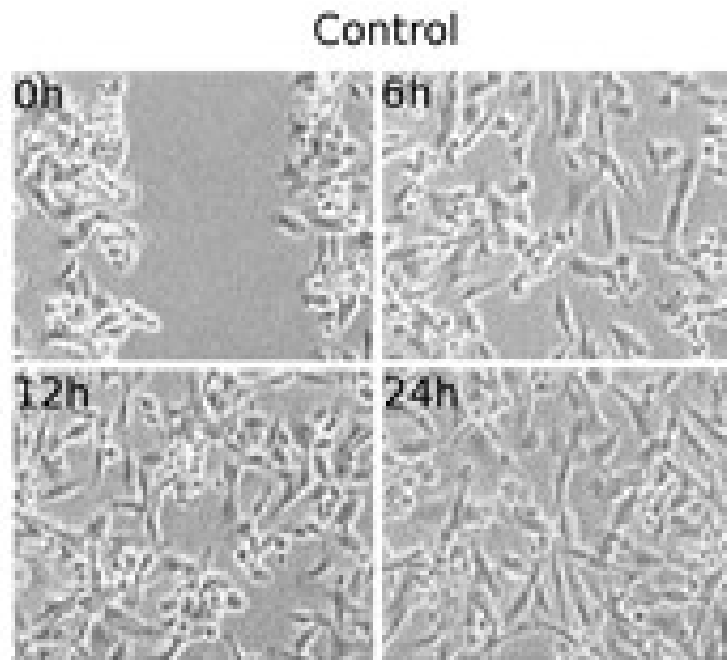
¹Dipartimento Scienze Biomediche Sperimentali e Cliniche; Università degli Studi di Firenze; Firenze, Italy; ²Istituto di Scienze dell'Alimentazione; Consiglio Nazionale delle Ricerche (ISA-CNR); Avellino, Italy; ³Laboratorio di Zoologia e Biologia Marina; Dipartimento di Biologia Animale e dell'Uomo; Università degli Studi di Torino; Torino, Italy; ⁴Centro Interuniversitario di Biologia Marina ed Ecologia Applicata (CIBM); Livorno, Italy



POE effetto di riduzione invasività cellule tumorali umane

Cellule tumorali con fenotipo maligno mantengono le MMP attive ed alta espressione

Cellule trattate con POE hanno ridotta espressione di MMP e ridotta invasività

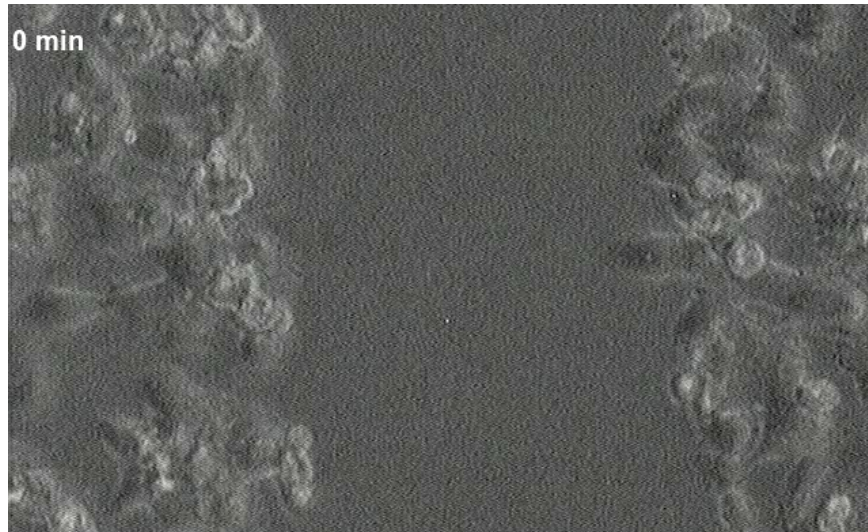


Invasività delle cellule tumorali umane

Cellule tumorali non trattate mantengono il fenotipo aggressivo

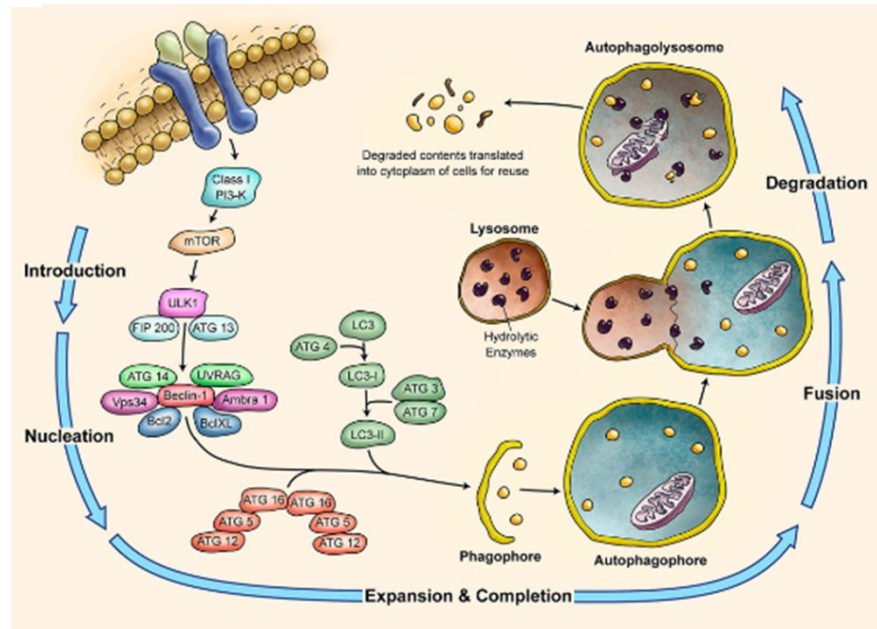


Cellule trattate con POE hanno ridotta invasività



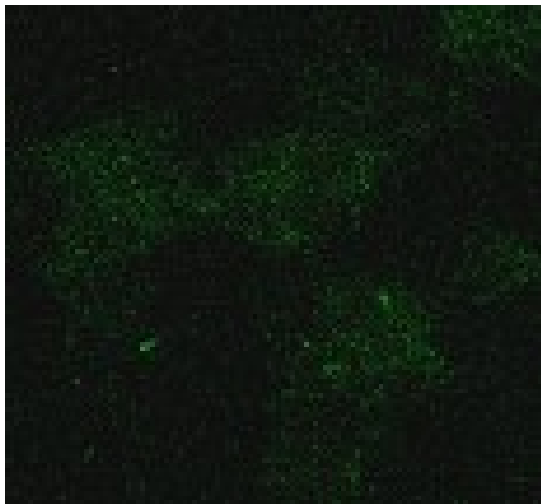


Abbiamo cercato di spiegare le vie molecolari di segnalazione indotte da POE

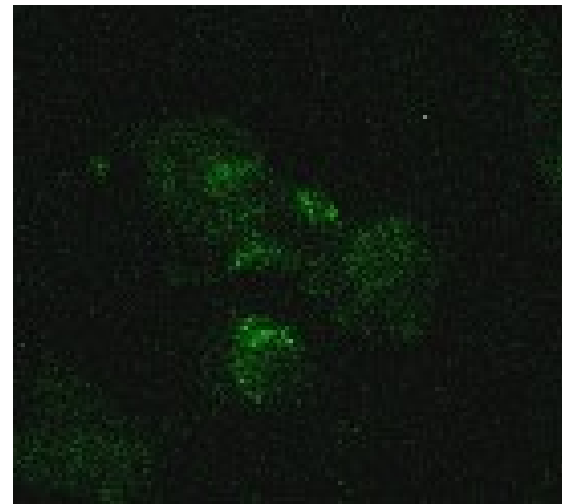


Immagini al microscopia confocale che mostrano la presenza di autofagolisosomi maturi

Cellule tumorali non trattate



Cellule tumorali trattate con POE



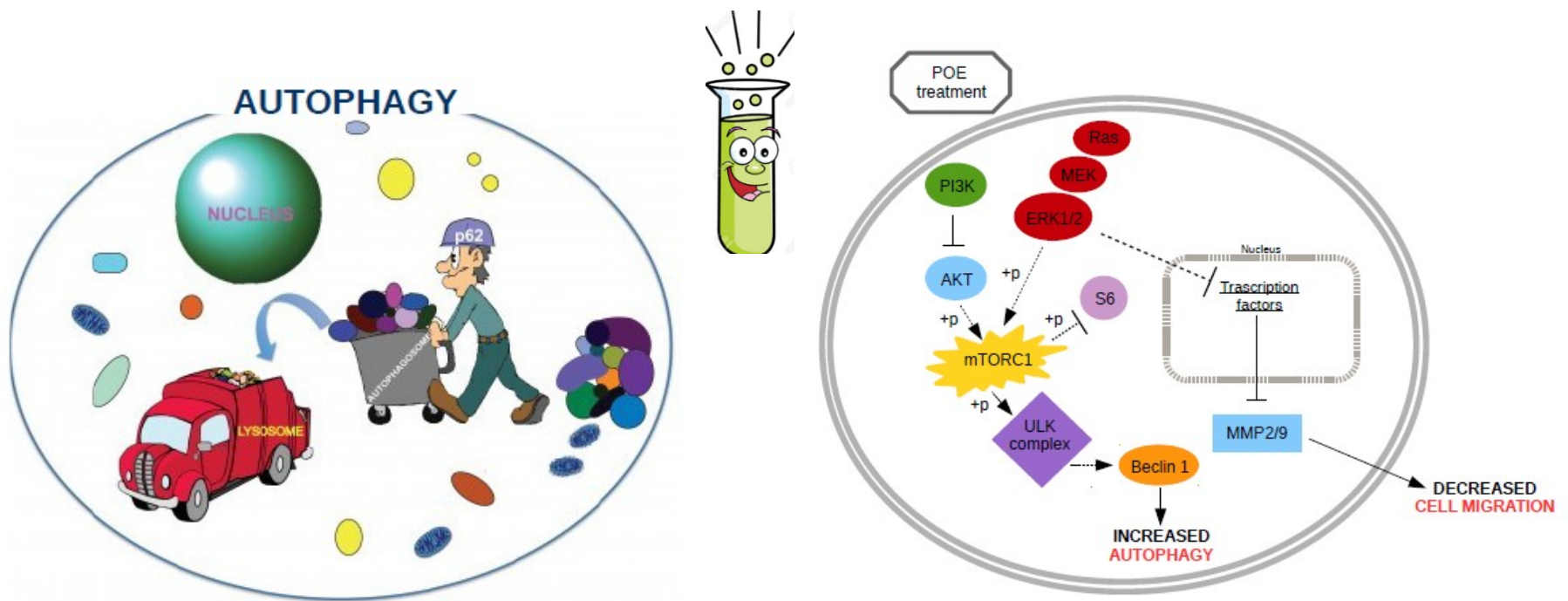
Posidonia oceanica extracts impairs malignant cell migration by autophagy modulation

Leri Manuela^{1*}, ¹Ramazzotti Matteo^{1*}, Vasarri Marzia ^{1,2}, Peri Sara¹, Barletta Emanuela¹, Pretti Carlo² and Degl'Innocenti Donatella^{1,2}

¹ Dipartimento di Scienze Biomediche, Sperimentali e Cliniche, Università degli Studi di Firenze, Italy

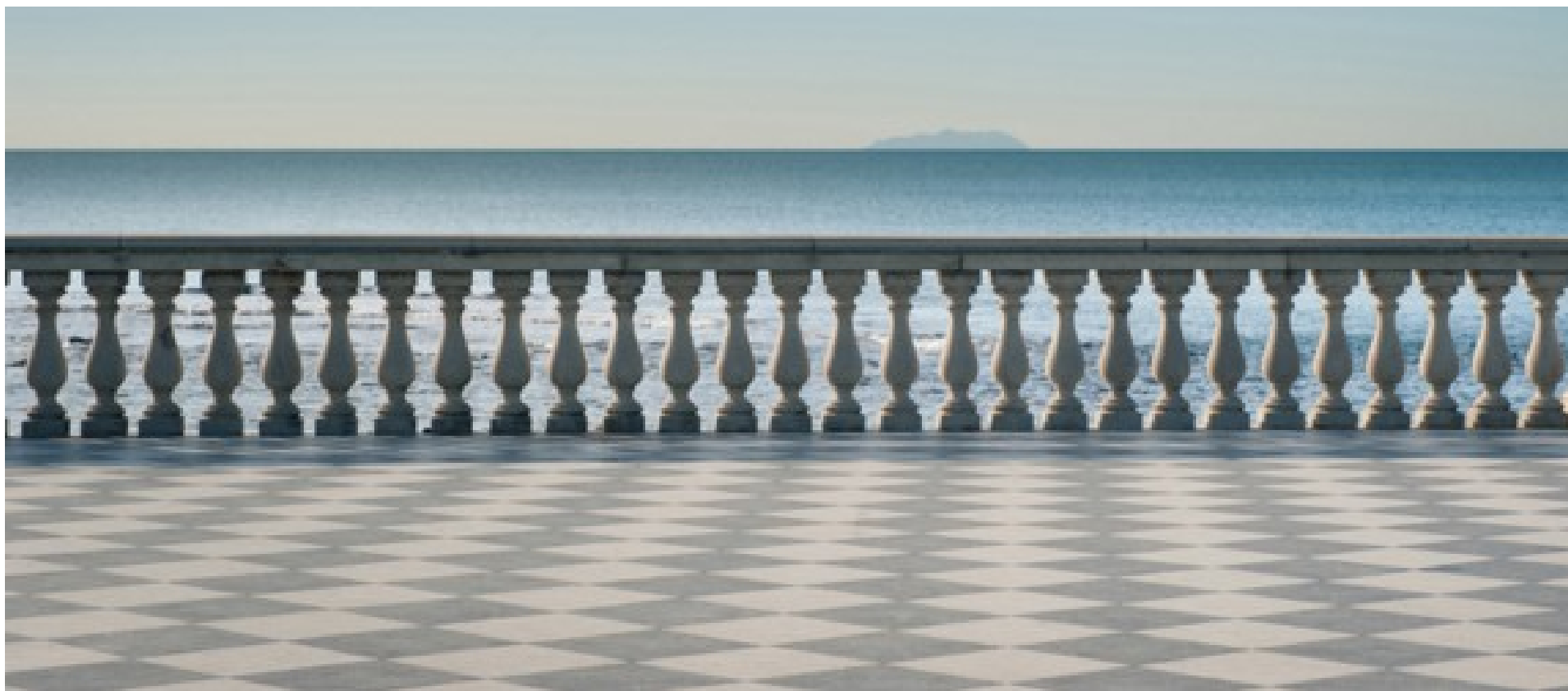
² Centro Interuniversitario di Biologia Marina ed Ecologia Applicata "G. Bacci", Livorno, Italy

2017 submitted



Fondazione Livorno Rif. N.2015.0188

Ringrazio per l'attenzione



....un mare di possibilità
