

F. Naselli<sup>1</sup>, S. Volpes<sup>1</sup>, C. Santalucia<sup>2</sup>, A. Girgenti<sup>2</sup>, F. Caradonna<sup>2</sup>, P. Picone<sup>2</sup>, D. Nuzzo<sup>2</sup>

1. Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche, Università di Palermo, (STEBICEF- Sezione di Biologia Cellulare), Viale delle Scienze, Edificio 16 - 90128 Palermo, Italy.

2. Istituto per la Ricerca e l'Innovazione Biomedica, CNR, Via U. La Malfa, 153 - 90146 Palermo, Italy.

## INTRODUZIONE

Le microalghe comprendono cianobatteri procarioti e protisti fotoautotrofi eucarioti, con una significativa diversità nel loro metabolismo, struttura cellulare e habitat. Questi microrganismi fotosintetici mostrano interesse commerciale per la loro capacità di produrre biomassa da cui si possono ottenere composti bioattivi. Le microalghe sono generalmente considerate un'ottima fonte di vitamine, minerali e molecole bioattive che le rendono adatte ad essere introdotte nell'industria cosmetica, farmaceutica e alimentare. *Aphanizomenon flos-aquae* (AFA), una microalga commestibile, contiene numerose biomolecole potenzialmente in grado di prevenire alcune patologie. Numerose biomolecole fisiologicamente attive derivate dalle alghe sono state studiate per il loro ruolo nella prevenzione delle malattie e per la salute e per il loro potenziale utilizzo come integratori alimentari. Ad esempio, alcuni autori hanno dimostrato i benefici terapeutici della feniletilamina (PEA), un neuromodulatore endogeno presente nelle alghe AFA e che, se carente, può portare a determinate forme di depressione e disturbi affettivi. In questi anni, il ruolo delle microalghe come agenti protettivi è stato studiato a livello molecolare e i loro benefici sono stati ampiamente dimostrati.

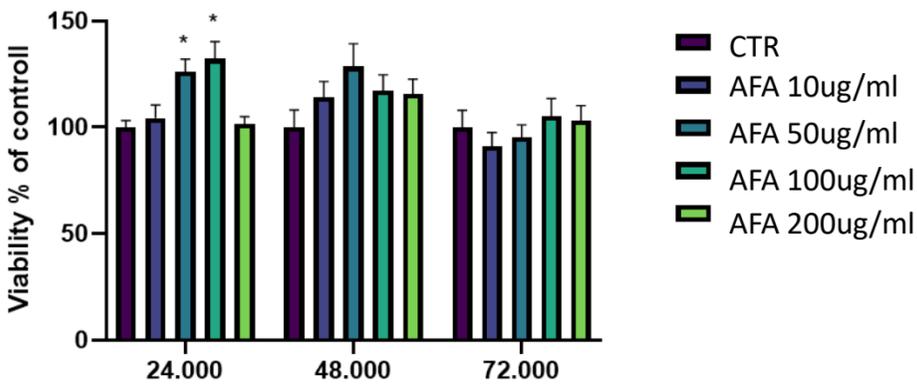
## SCOPO

Indagare se l'AFA potesse modulare il genoma a livello epigenetico. In particolare, valutare la tossicità dell'AFA e la capacità di modulare la metilazione del DNA utilizzando una linea cellulare intestinale normale.

## MATERIALI E METODI

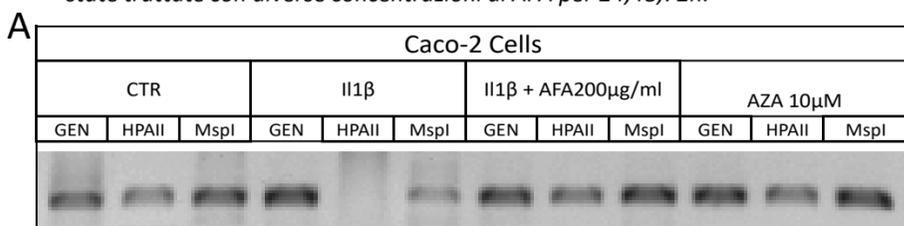
Le cellule Caco-2 differenziate sono state pre-trattate con IL1 $\beta$  per 24h allo scopo di indurre infiammazione, successivamente le stesse sono state trattate con AFA 200 $\mu$ g/ml o con Aza 10  $\mu$ M. Il DNA estratto da ogni campione cellulare differenzialmente trattato o non trattato è stato sfruttato per le successive analisi. Per studiare lo stato di metilazione del DNA dell'intero genoma delle cellule trattate e non trattate abbiamo utilizzato una PCR sensibile alla metilazione: Methylation-Sensitive Arbitrarily-Primed - Polymerase Chain Reaction (MeSAP-PCR). Lo stato di metilazione di promotori di geni di citochine pro-infiammatorie come interleuchina 8 (IL8) è stato studiato attraverso la Methylation Sensitive Restriction Endonuclease-PCR (MSRE-PCR).

## RISULTATI

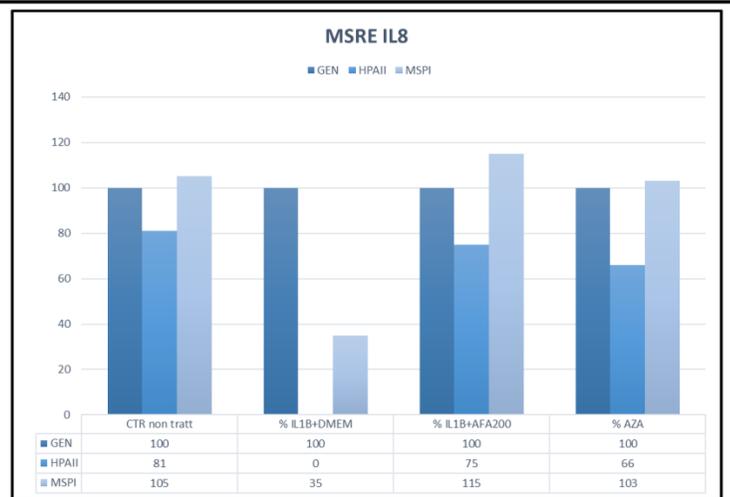


**Fig.1** Vitalità cellulare valutata tramite saggio MTT, Misurata come % di cellule vive rispetto al controllo. Cellule Caco2 sono state trattate con diverse concentrazioni di AFA per 24,48,72h.

I nostri risultati indicano che AFA non mostra tossicità sulle cellule Caco-2, anche ad elevate concentrazioni e per tempi prolungati fino a 72h (Fig.1). In cellule Caco-2 differenziate esposte all'azione pro-infiammatoria dell'interleuchina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) per 24h, il promotore di IL8 risulta demetilato. Il trattamento con AFA 200 $\mu$ g/ml per ulteriori 24h è in grado di invertire l'effetto demetilante indotto dall'IL-1 $\beta$  sul promotore del gene IL8 (Fig2 A gel di poliaccrilammide, B analisi densitometrica delle bande di DNA). Inoltre AFA 200 $\mu$ g/ml modula la metilazione del DNA a livello globale, inducendo demetilazione in maniera simile all'azione del noto agente demetilante 5-Azacidina (Fig.3 A gel di poliaccrilammide, B analisi densitometrica delle bande di DNA).



**Fig. 2**-Gel di poliaccrilammide che individua bande di DNA genomico e digerito con enzimi di restrizione metilazione sensibili di CACO2 differenziate non trattate, pretrattate con IL1 $\beta$  24h e successivamente con AFA 200ng/ $\mu$ L 24 h o trattate solamente con sola AZA 10 $\mu$ M come controllo positivo(A). Scansione densitometrica delle bande di DNA (B)



## MeSAP-PCR CACO2

DEMETILAZIONE ← → IPERMETILAZIONE



**Fig. 3 B** Istogramma analisi densitometriche di MeSAP-PCR su cellule CACO2 differenziate: si evince un notevole effetto demetilante a livello genomico dal trattamento con AFA (200 $\mu$ g/ml) a livelli anche più elevati di AZA.

## CONCLUSIONI

I nostri risultati indicano che AFA non mostra tossicità sulle cellule Caco-2, anche ad elevate concentrazioni. Inoltre, abbiamo osservato che AFA modula la metilazione del DNA a livello globale, con particolare rilevanza nel contesto dell'effetto epigenetico indotto dall'infiammazione. Queste osservazioni contribuiscono alla comprensione dei meccanismi epigenetici coinvolti nell'interazione tra AFA e le cellule intestinali, fornendo spunti interessanti per ulteriori ricerche sull'impiego potenziale dell'AFA come agente modulatore dell'infiammazione e dell'espressione genica.