

L'acqua termale di Nitrodi effettua una sottoregolazione della proteina S-nitrosilazione nelle cellule RKO

ANTONIETTA AVERSANO^{1*}, FRANCESCA WANDA ROSSI^{2*}, FRANCESCA CAMMAROTA^{1,3},

AMATO DE PAULIS², PAOLA IZZO^{1,3*} e MARINA DE ROSA^{1,3*}

Dipartimenti della ¹Medicina Molecolare e della Biotecnologia Medica, e ²Scienze Mediche Traslazionali, Università di Napoli Federico II, I-80131 Napoli; ³CEINGE-Biotecnologie Avanzate, I-80145 Napoli, Italia

Ricevuto il 30 gennaio 2020; Accettato il 23 giugno 2020

Identificazione digitale: 10.3892/ijmm.2020.4676

Sintesi.

La balneoterapia e la terapia con acque termali sono state utilizzate per il trattamento delle malattie da tempi immemorabili. Inoltre, le prove disponibili dimostrano che gli effetti benefici delle acque termali continuano per vari mesi dopo il completamento del trattamento. I meccanismi attraverso i quali le acque termali esercitano il loro effetto curativo rimangono sconosciuti. Sia la terapia balneologica che quella idroponica presso le “più antiche acque termali del mondo”, cioè quelle della sorgente di Nitrodi sull'Isola di Ischia (Italia meridionale), sono efficaci per una serie di malattie e condizioni di salute. L'obiettivo di questo studio è di indagare sulla base molecolare sottostante gli effetti terapeutici delle acque della sorgente di Nitrodi nelle condizioni associate alle infiammazioni di basso grado e allo stress. A questo scopo, è stato concepito un modello in vitro, attraverso il quale le cellule da adenocarcinoma coloretale RKO sono state trattate con una soluzione salina tamponata al fosfato o con una soluzione salina tamponata al fosfato preparata con acqua di Nitrodi per 4 ore al giorno, per un periodo di 5 giorni a settimana per 6 settimane. Le cellule RKO sono state soggette ai seguenti saggi: saggio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio bromuro, saggio della migrazione Transwell, analisi Western Blot, rilevamento fluorimetrico delle proteine di S-nitrosotioili, e analisi Western Blot della S-nitrosilazione. I risultati hanno rivelato che l'acqua della sorgente di Nitrodi era in grado di favorire la migrazione e la vitalità delle cellule, e di effettuare la sottoregolazione della proteina S-nitrosilazione, probabilmente anche nel caso della forma attiva nitrosilata della proteina ciclossigenasi-2 (COX). Questi risultati concordano con tutte le proprietà terapeutiche dell'acqua della sorgente di Nitrodi segnalate in precedenza, e quindi rafforzano il concetto secondo il quale questa risorsa naturale rappresenta un'importante terapia complementare alla medicina tradizionale.

Introduzione

La balneoterapia rappresenta un approccio complementare clinicamente efficace nel trattamento delle infiammazioni di basso grado e delle condizioni associate allo stress (1).

I meccanismi biologici, attraverso i quali l'immersione nelle acque minerali-medicinali e l'applicazione di fango minerale alleviano i sintomi di varie malattie, rimangono ampiamente sconosciuti. Comunque, è risaputo che le risposte neuroendocrine e immunologiche alla balneoterapia, compresa l'immunità umorale e cellulo-mediata, sono associate a questi meccanismi, e conducono agli effetti antinfiammatori, analgesici, antiossidanti, condroprotettivi e anabolici, oltre che alla regolazione neuroendocrina-immune in varie condizioni di salute (2,3).

La regione Campania dell'Italia meridionale è una delle regioni più ricche, a livello mondiale, in termini di risorse di acque minerali e termali. Effettivamente, grazie alle loro proprietà chimiche e fisiche, queste acque sono state utilizzate per finalità terapeutiche fin dai tempi dei Romani (4-6). I Romani di 2.000 anni fa conoscevano la fonte di Nitrodi sull'Isola di Ischia, nella Baia di Napoli, come ne sono prova gli ex-voto in marmo, datati I sec. a.C. e II sec. d.C., reperiti sull'isola. In particolare, la Scuola di Idrologia Medica, frequentata da importanti medici come Menippo, Aurelius Monnus, Numerius Fabius, era collegata alle fonti di Nitrodi. È stato suggerito che il suo nome derivi dalla parola "nitro", e specificamente "soda", infatti, si riteneva che le acque fossero ricche di questo composto.

L'acqua minerale termale viene classificata sulla base della sua composizione chimica e temperatura, in acqua a bassa mineralizzazione, a media mineralizzazione e ad alta mineralizzazione, e viene classificata come fredda (<20° C), ipotermale (20-30° C), termale (>30-40° C) e ipertermale (>40° C) (7). La classificazione secondo Marotta e Sica (8,9), che è quella più ampiamente accreditata in Italia (10), si basa sulla temperatura, sul residuo fisso e sulla composizione chimica (8,9). In base a questa classificazione, l'acqua di Nitrodi presenta le seguenti caratteristiche: "Contenuto minerale medio, acque termali, bicarbonato, solfato e alcalino, e terroso" (8,9). Il suo residuo secco a 180° C è di circa 0,9598 g/l, la sua temperatura sorgente è di circa 28° C, la sua concentrazione è di circa 0,4758 g/l HCO₃⁻, 0,2200 g/l SO₄⁻, 0,1676 g/l NA⁺ e 0,1182 g/l Ca⁺⁺ (componente di residuo secco di 1 l d'acqua: Na, 0,167 g; Ca⁺⁺ 0,118 g; SO₄⁻, 0,220 g; CO₃⁻, 0,234 g). Le sue componenti principali sono il sodio, il calcio, il cloro, lo zolfo e il carbonio (11). Sebbene l'ultima analisi ufficiale delle acque di Nitrodi risalga al 1984, i risultati sono stati confermati dall'Università di Napoli Federico II, in occasione di un'analisi condotta nel 2003, che è stata riconosciuta dal Ministero della Salute italiano (Decreto n. 3509, 9 ottobre 2003 '<https://www.fonteninfenitrodi.com/la-fonte/pubblicazioni/>'), e dall'analisi chimica e chimico-fisica effettuata nel 2018, a seguito della quale venne rilasciato un rapporto firmato (dati non pubblicati).

Inoltre, nel mese di ottobre 2003, il Ministero della Salute italiano ha riconosciuto le proprietà terapeutiche dell'acqua di Nitrodi. Effettivamente, quando vengono ingerite o applicate sotto forma di bagni di fango, è stato dimostrato che le acque sono efficaci per il trattamento di vari disturbi (6,11). Ad esempio, negli anni '50, Manciola (11) segnalò che le acque di Nitrodi promuovevano e regolavano la diuresi, miglioravano la capacità funzionale dei reni, e risolvevano, o notevolmente alleviavano, la gastrite e la gastroduodenite. Le acque rappresentano inoltre un eccellente coadiuvante nel trattamento delle ulcere gastroduodenali, delle vene varicose, delle ferite, delle fistole e dei brufoli, e migliorano la salute e l'aspetto della pelle (11). Comunque, i meccanismi molecolari alla base degli effetti benefici delle acque di Nitrodi non sono ancora stati chiariti. Di conseguenza, il presente studio ha valutato la componente molecolare alla base dei benefici delle acque di Nitrodi per la guarigione delle ferite e delle malattie infiammatorie.

Corrispondenza a: Professoressa Marina de Rosa, Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologia Medica, Università di Napoli Federico II, Via S. Pansini 5, I-80131 Napoli, Italia E-mail: derosam1966@gmail.com

Professoressa Francesca Wanda Rossi, Dipartimento di Scienze Mediche Traslazionali, Università di Napoli Federico II, Via S. Pansini 5, I-80131 Napoli, Italia E-mail: frawrossi@yahoo.it

*hanno contribuito in ugual misura

Parole chiave: balneoterapia, acque minerali termali, nitrosilazione proteinica, inattivazione della ciclossigenasi-2, effetto anti-infiammatorio

Materiali e metodi

Linee cellulari e coltura. La linea cellulare RKO (ATCC) è stata utilizzata per esplorare la base molecolare degli effetti benefici delle acque di Nitrodi sulle "malattie infiammatorie", nel momento in cui sovraesprimono i recettori IL-6 e IL-6 (12), che sono le principali citochine della cascata infiammatoria (13) e di varie malattie infiammatorie che coinvolgono il comparto gastrointestinale. Le cellule RKO erano cresciute nel mezzo minimo essenziale di Eagle, con il supplemento di siero bovino fetale al 10%, 100 U/ml di penicillina e 100 µg/ml di streptomina (mezzo completo). Le cellule sono state trattate con soluzione salina tamponata al fosfato (PBS) preparata con l'acqua di Nitrodi (PBS-Nitrodi) per 4 h/giorno, 5 giorni a settimana, e per 6 settimane, e quindi analizzate in base alla procedura descritta di seguito. Il trattamento con il solo PBS ha funto da controllo.

Saggi della migrazione. La migrazione delle cellule è stata valutata utilizzando la camera Boyden in vitro e i saggi di guarigione delle ferite, come viene descritto altrove (14). Brevemente,

per svolgere i saggi di guarigione delle ferite, le cellule trattate come descritto in alto per 6 settimane sono state messe in coltura in base al rapporto 1×10^4 cellule/pozzetto in 6 piastre pozzetto. Dopo aver formato un mono-strato (confluenza del 95-100%), le cellule sono state sciacquate e quindi un mezzo, senza FBS, è stato aggiunto nel corso della notte (14 h); successivamente, ferite da graffio sono state procurate con la punta di una pipetta da 200- μ l, e il graffio è stato fotografato sotto la luce di un microscopio luminoso (Leica Automated Inverted Microscope for Life Science Research Leica DMI4000 B, Tipo DMI400B 11888318, numero di serie 279034) con un ingrandimento di 5x. Le cellule sono state di nuovo incubate per 4 h con PBS (RKO-PBS) o con PBS-Nitrodi (RKO-Nitrodi), sciacquate, e quindi il mezzo senza FBS è stato aggiunto. E infine, dopo 24 h dal graffio, le cellule sono state fotografate una seconda volta. L'esperimento è stato ripetuto 3 volte. Un saggio nella camera Boyden è stato eseguito utilizzando i sistemi di saggio della migrazione delle cellule colorimetrici QcM™ a 24 pozzetti (dimensioni del poro: 8,0 μ m; Millipore EMD). Un'aliquota da 300 μ l di una sospensione di 1×10^6 cellule/ml è stata risospesa nel mezzo privo di siero e messa in coltura nella camera superiore di un inserto da 24 pozzetti. Successivamente, 500 μ l di mezzo libero (preparato in base alle istruzioni del produttore) sono stati aggiunti al pozzetto inferiore della piastra di migrazione. E infine, le cellule sono state rimosse dal lato superiore della membrana, le cellule migrate sono state colorate per 10 minuti a temperatura ambiente con una soluzione violetta cristallo (Sigma-Aldrich; Merck KGaA), (Sigma-Aldrich; Merck KGaA), la colorazione è stata estratta e la densità ottica è stata misurata a una lunghezza d'onda di 560 nm, in base alle istruzioni del produttore (BioTek Synergy Microplate Reader; BioTek Instruments, Inc.). I risultati rappresentano la mediana di 4 esperimenti.

Saggio della vitalità delle cellule. La vitalità delle cellule è stata analizzata tramite saggio a base di 3-(4, 5-dimetiltiazolo-2-yl)-5-(3-carbossimetossifenile)-2-(4-sulfofenile)-2H tetrazolio MTT), come precedentemente descritto (15). Le sospensioni delle cellule (500 μ l) dalle cellule RKO-PBS e RKO-Nitrodi, contenenti 3×10^4 cellule vive, sono state piastrate in 24 piastre multi-pozzetto. Per misurare la riduzione MTT tramite il saggio colorimetrico, le cellule sono state irrigate e incubate per 3 h in 100 μ l di dMEM senza fenolo rosso (D2429, Sigma-Aldrich; Merck KGaA), e supplementate con 0,45 mg/ml MTT. Il mezzo è stato poi sostituito con 100 μ l 0,1 M HCl in isopropanolo, e le cellule sono state incubate a una temperatura di 37° C per 30 minuti, per effettuare la lisi. Il formazan insolubile è stato quindi risospeso e le densità ottiche sono state misurate a una lunghezza d'onda di 570 nm utilizzando un lettore a micropiastra (BioTek Synergy Microplate Reader; BioTek Instruments, Inc.), in base al protocollo del produttore MTT. I risultati rappresentano la media di 3 esperimenti, ciascuno svolto in formato duplicato.

Analisi della crescita delle cellule. Per analizzare la crescita delle cellule, 2×10^4 cellule sono state messe in coltura in una piastra per coltura da 24 pozzetti, tripsinizzate e contate ogni 24 h, cioè, a 24 (T24 h), 48 (T48 h), 72 (T72 h) e 96 ore (T96 h) dopo la coltura, utilizzando un apparato

a camera Burker. Gli esperimenti sono stati svolti in formato triplicato per ciascun punto sperimentale.

Analisi Western Blot. Estratti totali di proteine sono stati isolati dalle cellule RKO trattate con PBS o PBS-Nitrodi per 6 settimane, come descritto in precedenza (16). Le concentrazioni sono state determinate utilizzando un kit per saggio delle proteine e adottando standard di albumina del siero bovino, in base alle istruzioni del produttore (Bio-Rad Laboratories, inc.). Le proteine sono state separate tramite elettroforesi dei gel SDS-poliacrilamide a una concentrazione del 12%, e i Blot erano stati preparati utilizzando la procedura descritta in precedenza (17). Le membrane di nitrocellulosa sono state colorate con una soluzione Ponceau allo 0,1% (w/v) in acido acetico al 5% (P7170, Sigma-Aldrich; Merck KGaA), per 5 minuti a temperatura ambiente. Dopo il blocco, le membrane sono state incubate nel corso della notte in una soluzione contenente l'anticorpo primario a una temperatura di 4° C. L'anticorpo primario contro la ciclossigenasi (COX)-2 (coniglio policlonale anti-umano; ab15191; diluizione 1:1.000) proveniva da Abcam; l'anticorpo MMP2 (coniglio policlonale 1 anti-umano; NB200-193, diluizione 1:10.000) proveniva da Novus Biologicals. L'anticorpo anti-GAPdH (topo monoclonale anti-umano; sc-69778; diluizione 1:50.000) proveniva da Santa Cruz Biotechnology, Inc. Le membrane sono state sondate con anticorpi secondari coniugati in contro coniglio (coniglio monoclonale anti-umano; N. 7074S; Cell Signaling Technology, Inc.; diluizione, 1:3.000) o topo IgG (monoclonale anti-topo; N. 7076S; Cell Signaling Technology, Inc.; diluizione, 1:3.000) per 1 h a temperatura ambiente e fasce immunoreattive sono state rilevate utilizzando la chemiluminescenza HRP - Substrate Immobilon Western (EMd Millipore). L'esperimento è stato ripetuto 3 volte. La densitometria è stata eseguita utilizzando il software ImageJ 1.45s..

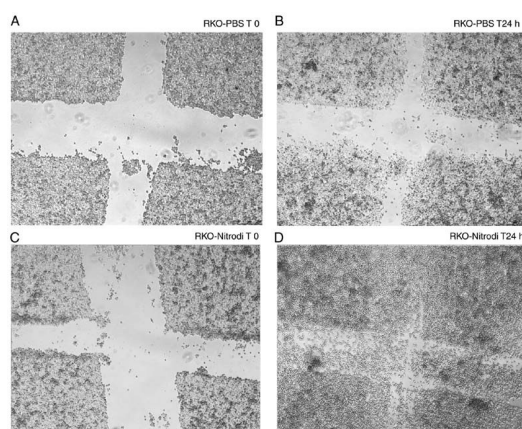


Figura 1. L'acqua della sorgente di Nitrodi promuove la migrazione delle cellule in un saggio di guarigione delle ferite in vitro. Immagini in modalità Brightfield con ingrandimento x5 delle cellule di controllo RKO-PBS e delle cellule trattate con RKO-Nitrodi, nel corso del saggio di guarigione delle ferite. Le chiusure delle ferite sono state sottoposte a

imaging subito dopo la graffiatura (T0), in (A) cellule trattate con PBS e (C) cellule trattate con Nitrodi, e 24 ore dopo (T24 h), in (B) cellule trattate con PBS e (D) cellule trattate con Nitrodi.

Rilevamento fluorometrico degli S-nitrosotioili. Il metodo fluorometrico segnalato da Wink et al (18) è stato utilizzato per rilevare gli S-nitrosotioili. In breve, le cellule RKO sono state trattate con PBS o Nitrodi-PBS, come descritto in alto. Dopo l'estrazione totale della proteina, 100 µg di proteine sono stati fatti reagire con 100 µM 2,3-diaminonaftalene in presenza di 100 µM di HgCl₂, per ciascun campione, e incubati al buio per 30 minuti a temperatura ambiente. Il composto fluorescente generato 2,3-naftil-triazole è stato quindi misurato a una lunghezza d'onda di eccitazione di 375 nm e a una lunghezza d'onda di emissione di 450 nm, con un lettore a micropiastra (BioTek Synergy Microplate Reader; BioTek Instruments, Inc.).

Rilevamento delle modifiche post-traslazionali alla proteina S-nitrosocisteina. Le modifiche post-traslazionali alla proteina S-nitrosocisteina sono state rilevate utilizzando il saggio Western Blot S-Nitrosilazione Pierce™ in base alle istruzioni del produttore (Pierce; Thermo Fisher Scientific, Inc.). In breve, le cisteine non modificate sono state inizialmente bloccate utilizzando un composto reattivo al sulfidril, il metanetiosulfonato di metile. Le cisteine S-nitrosilate sono state quindi selettivamente ridotte con ascorbato in un Tampone HENS, per una specifica etichettatura con reagente iodoTMTzero, che si lega in modo irreversibile al tiolo di cisteina che era stato S-nitrosilato. Il rilevamento delle proteine modificate con reagente TMT viene facilitato dall'utilizzo di un anticorpo anti-TMT ottenuto tramite il saggio.

Analisi statistica. Tutti i dati sono stati ottenuti tramite almeno 3 esperimenti indipendenti e vengono segnalati come errore standard ± della media (SEM, Standard Error of the Mean). Il t-test di Student è stato utilizzato per valutare le differenze tra i 2 gruppi. Si è ritenuto che P<0,05 indicasse una differenza statisticamente significativa. Tutti gli esperimenti sono stati ripetuti 3 volte, come repliche biologiche che producevano gli stessi risultati.

Risultati

L'acqua della sorgente di Nitrodi promuove la migrazione e la vitalità delle cellule.

Per indagare sugli effetti dell'acqua della sorgente di Nitrodi sulla migrazione delle cellule in vitro, sono stati eseguiti saggi di migrazione per la guarigione delle ferite e della camera di Boyden, come viene descritto in "Materiali e metodi", ed è stato riscontrato che le acque di Nitrodi promuovono la migrazione delle cellule. Effettivamente, come viene mostrato nella Figura 1, 24 h dopo la graffiatura, le ferite erano quasi completamente guarite nelle cellule trattate con PBS-

Nitrodi (Figure 1C e D), mentre la dimensione delle ferite nelle cellule incubate con solo PBS rimaneva essenzialmente inalterata (Figure 1A e B), Risultati simili sono stati ottenuti con il saggio della camera Boyden (Fig. 2). L'acqua di Nitrodi aveva promosso la migrazione delle cellule RKO, come viene mostrato nelle immagini della colorazione violetta cristallo delle cellule sottoposte a controllo PBS (Fig. 2A) e delle cellule trattate con l'acqua di Nitrodi (Fig. 2B). Effettivamente, la densità ottica violetta cristallo delle cellule migrate, misurata secondo una lunghezza d'onda di 540 nm, ha fornito un risultato rispettivamente di 0,416 e 0,594 nm nelle cellule trattate con PBS e in quelle trattate con PBS-Nitrodi, (Fig. 2C). Inoltre, come viene indicato nelle Figure 3A e B, la vitalità delle cellule è stata approssimativamente del 62% maggiore nel caso delle cellule trattate con l'acqua di Nitrodi, rispetto a quelle trattate con il solo PBS. I valori della densità ottica media, misurati secondo una lunghezza d'onda di 570 nm, sono stati rispettivamente di 0,0474 e di 0,0758 nm nelle cellule trattate con PBS e con PBS-Nitrodi, (Fig. 3B). Inoltre, le cellule trattate con acqua di Nitrodi sono cresciute a una velocità notevolmente maggiore rispetto a quelle controllate con PBS (Fig. 4).

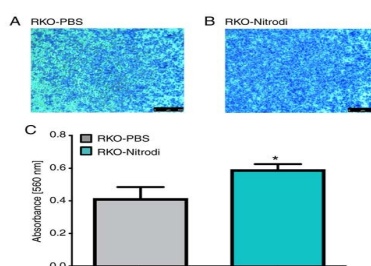


Figura 2. L'acqua della sorgente di Nitrodi promuove la migrazione delle cellule nel saggio della migrazione Transwell in vitro. Immagini in modalità Brightfield a ingrandimento di x4 di colorazione violetta cristallo delle cellule (A) RKO-PBS e (B) RKO-Nitrodi. (C) densità ottica violetta cristallo delle cellule migrate, misurate a una lunghezza d'onda di 560 nm con un lettore a micropietra. Le barre rappresentano l'assorbenza media \pm SEM degli esperimenti svolti in formato triplicato. * $P < 0,05$ (differenza statisticamente significativa; t-test).

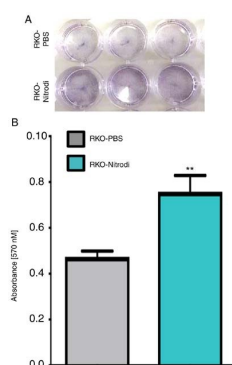


Figura 3. L'acqua della sorgente di Nitrodi promuove la vitalità delle cellule in vitro. (A) Immagini di Formazan non solubile in acqua prodotto dal saggio MTT. (B) Analisi di sali risospesi misurati a una lunghezza d'onda di 570 nm da un lettore a micropietra. Le barre rappresentano l'assorbenza media \pm SEM degli esperimenti svolti in formato triplicato. ** $P < 0,005$ (differenza statisticamente significativa; t-test).

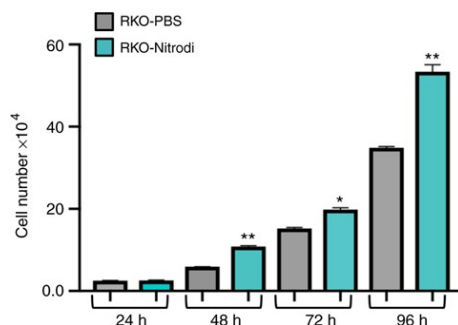


Figura 4. L'acqua della sorgente di Nitrodi promuove la crescita delle cellule in vitro. Le barre rappresentano il numero di cellule medio contato di cellule RKO-PBS e di cellule RKO-Nitrodi \pm SEM, al tempo sperimentale di T24, T48, T72 e T96 h, come descritto nella sezione "Materiali e metodi". * $P < 0,05$ e ** $P < 0,005$ (differenza statisticamente significativa; t-test).

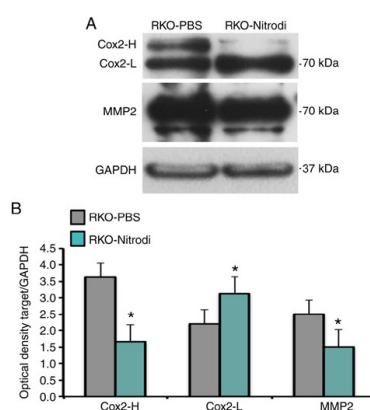


Figura 5. L'acqua della sorgente di Nitrodi induce cambiamenti nell'espressione di COX-2 e MMP2. (A) Le immagini rappresentative del Western Blot mostrano l'espressione dei livelli di proteine COX-2 e MMP2 nelle cellule trattate con PBS e acqua di Nitrodi. GAPdH è stato utilizzato come controllo di caricamento. (B) Il grafico mostra l'analisi densitometrica dell'isoforma COX-2-H, dell'isoforma COX-2-L e di MMP2, rispetto a GAPdH. I grafici a barra rappresentano le medie \pm SEM (3 esperimenti indipendenti).

* $P < 0,05$ (differenza statisticamente significativa rispetto alle cellule RKO-BPS; t-test).

L'acqua della sorgente di Nitrodi effettua una sottoregolazione della proteina S-nitrosilazione.
L'acqua della sorgente di Nitrodi effettua una sottoregolazione della proteina S-nitrosilazione.

Per scoprire se l'acqua di Nitrodi effettua la sottoregolazione della proteina S-nitrosilazione, è stata eseguita l'analisi Western Blot di rilevamento fluorometrico del S-nitrosotiole e della S-nitrosilazione. La reazione specifica tra 2,3-diaminonaftalene e HgCl₂, eseguita per rilevare gli S-nitrosotiole, genera il composto fluorescente 2,3-naftil-triazole che emette luce a una lunghezza d'onda di 450 nm. Come mostrato nella Fig. 6A, la luce emessa misurata ad una lunghezza d'onda di 450 nm, appariva approssimativamente inferiore del 50% nelle cellule RKO-Nitrodi, rispetto alle cellule di controllo RKO-PBS. I valori OD medi corrispondevano a 176 nelle cellule RKO-PBS e a

93 nelle cellule RKO-Nitrodi. Questi risultati sono stati confermati tramite un'analisi Western Blot della S-nitrosilazione, che ha rivelato una marcata sottoregolazione della proteina S-nitrosilazione nelle cellule RKO-Nitrodi (Fig. 6B). La coloratura Ponceau e la proteina GAPdH sono servite come controlli interni (Fig. 6c).

Discussione

La balneoterapia e l'assunzione dell'acqua minerale termale vengono da tempo utilizzate per il trattamento di malattie come la dermatite atopica, la psoriasi, l'artrite reumatoide e l'osteoartrite, e anche per le malattie metaboliche e psicologiche. Questo trattamento, da solo o insieme ai trattamenti medici ortodossi, ha vissuto una fase di rinascimento nel corso dell'ultimo decennio (19). La balneoterapia esercita tre tipi di effetti: effetti meccanici o idrostatici, effetti termali in base alla temperatura dell'acqua, ed effetti chimici in base alla composizione dell'acqua che può essere salata, sulfurea, bicarbonata, carbonica e/o arricchita con altri specifici elementi. Un limite della balneoterapia è rappresentato dal fatto che i meccanismi attraverso i quali ciascun elemento contribuisce agli effetti terapeutici sono sconosciuti.

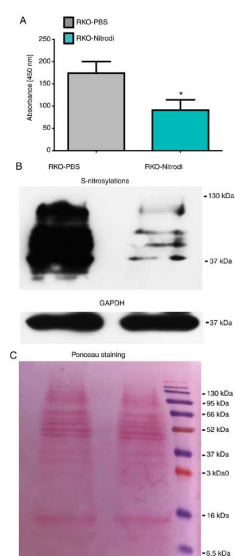


Figura 6. L'acqua della sorgente di Nitrodi induce la sottoregolazione della proteina S-nitrosilazione. Modifiche post-traslazionali della proteina S-nitrosocisteina erano state rilevate utilizzando il saggio Western Blot della S-nitrosilazione Pierce™, come viene descritto nella sezione "Materiali e metodi". (A) Il rilevamento fluorometrico degli S-nitrosotoli è stato misurato a una lunghezza d'onda di 450 nm tramite un lettore a micropiastra. Le barre rappresentano l'assorbimento medio \pm SEM degli esperimenti svolti in formato triplicato.

* $P < 0,05$ (differenza statisticamente significativa; t-test). (B) Immagine rappresentativa del Western Blot delle proteine S-nitrosilate (proteine modificate con reagente TMT rilevate con anticorpo anti-TMT). GAPdH è stato utilizzato come controllo di caricamento. (c) Immagine rappresentativa della coloratura Ponceau a seguito dell'elettroforesi SdS-Page di proteine estratte dalle cellule RKO-PBS e RKO-Nitrodi.

Inoltre, i meccanismi biologici attraverso i quali l'acqua medicinale minerale allevia i sintomi delle malattie rimangono ampiamente oscuri. Comunque, è stato ben documentato che la balneoterapia esercita effetti anti-infiammatori, analgesici e antiossidanti, unitamente alla regolazione neuroendocrina-immune, in vari disturbi (2,20-22).

Il presente studio intendeva fare luce sui meccanismi molecolari che sostengono l'efficacia terapeutica dell'acqua della sorgente di Nitrodi e fornire una solida base scientifica per migliorare la sua applicazione nella terapia balneologica e idroponica. A questo fine, le cellule RKO sono state trattate con l'acqua PBS-Nitrodi o con il solo PBS come controllo, per 4 h/giorno, 5 giorni/settimana, per un totale di 6 settimane. Questo protocollo in vitro imita il trattamento in vivo offerto ai pazienti e analizza gli effetti dell'acqua di Nitrodi sulle caratteristiche e sul metabolismo delle cellule. Utilizzando questa strategia, è stato dimostrato che l'acqua della sorgente di Nitrodi promuove la motilità e la vitalità delle cellule RKO, e induce la sottoregolazione della proteina S-nitrosilazione.

La S-nitrosilazione è un'importante modifica post-traslazionale indotta dall'ossido di azoto (NO), e consiste nell'accoppiamento della molecola NO con un tiolo di cisteina reattivo, per la formazione di un S-nitrosotiole (23-28). La S-Nitrosilazione è coinvolta nella regolazione del metabolismo dei carboidrati e dei lipidi; inoltre, la S-nitrosilazione anomala delle proteine è associata alle malattie cardio-vascolari, polmonari, muscolo-scheletriche, alle disfunzioni neurologiche e al cancro (29-33). Le prove raccolte dimostrano che la produzione di NO e la disregolazione della S-nitrosilazione sono eventi-chiave nella fase iniziale della neurodegenerazione (34) e della disfunzione neuronale nel morbo di Alzheimer (35). Il NO è anche un messaggero-chiave in occasione della patogenesi dell'infiammazione, ed esercita questo effetto attivando l'immunità innata e adattiva (36).

La S-nitrosilazione del COX-2 regola negativamente la sua attività enzimatica (37,38). Nel presente studio, a seguito dell'immunocolorazione e dell'autoradiografia, l'anticorpo COX2 ha riconosciuto una forma leggera di circa 70 kDa (COX-L) e un'altra isoforma di circa 72 kDa attribuibile alla forma attiva S-nitrosilata (COX-H). La differenza nella massa potrebbe essere compatibile con un diverso livello di nitrosilazione dei residui di cisteina del COX-2; comunque, la massa molecolare misurata tramite l'analisi Western Blot non è molto precisa. In conformità con questo risultato e con gli effetti terapeutici dell'acqua di Nitrodi, livelli più elevati di proteine totali non-nitrosilate sono stati trovati nelle cellule trattate con acqua PBS-Nitrodi piuttosto che nelle cellule di controllo trattate con PBS. In particolare, questi risultati suggeriscono che i livelli dell'isoforma non nitrosilata dell'enzima COX-2 erano superiori nelle cellule RKO-Nitrodi piuttosto che nelle cellule RKO-PBS. In conformità con questa ipotesi, anche il target COX-2 a valle MMP2 risultava sottoregolato a seguito dell'esposizione all'acqua di Nitrodi.

L'enzima COX-2 svolge un ruolo essenziale nella conversione dell'acido arachidico in eicosanoidi, promuovendo quindi la progressione dell'infiammazione e del tumore. Il presente

studio ha suggerito che i meccanismi molecolari attraverso i quali l'acqua di Nitrodi esercita i propri effetti anti-infiammatori riguardano l'inattivazione del COX-2 attraverso la sottoregolazione della proteina S-Nitrosilazione. In considerazione del ruolo essenziale che sia la S-nitrosilazione delle proteine che la cascata infiammatoria svolgono nella segnalazione delle cellule, nella funzione delle cellule e nella patogenesi delle malattie (23-33), i risultati del presente studio supportano l'applicazione dell'acqua della sorgente di Nitrodi nel trattamento di malattie come l'osteoartrite. In particolare, è stato recentemente dimostrato che l'osteoartrite è provocata dalla risposta infiammatoria allo stress da elevato sforzo di taglio nei fluidi (39).

L'elevato sforzo di taglio nei fluidi induce l'attivazione del COX-2 che, a sua volta, attiva l'espressione delle prostaglandine, degli MMP e delle citochine pro-infiammatorie (40). Inoltre, anche i pazienti affetti da artrite reumatoide, artrite psoriatrice, artrite reattiva o osteoartrite hanno elevati livelli di PGF_{2α} (41). Queste osservazioni concordano con i ben conosciuti effetti terapeutici positivi dell'acqua di Nitrodi sulle malattie infiammatorie come l'osteoartrite (2,3).

I dati del presente studio coincidono con la scoperta che le acque minerali esercitano un effetto terapeutico positivo sul sistema antiossidante, in particolare le acque minerali sulfuree (42,43). È stato anche dimostrato che il solfuro di idrogeno, rilasciato dallo zolfo, è in grado di aumentare il rilascio di citochine anti-infiammatorie (44). È concepibile che un meccanismo di azione simile potrebbe essere anche responsabile delle proprietà anti-infiammatorie dell'acqua della sorgente di Nitrodi, e che altre acque di sorgente minerale agiscano in modo simile anche tramite la modifica di altri meccanismi generali delle cellule biochimiche e molecolari, come nel caso dell'espressione microRNA (45).

Comunque, gli studi di biologia cellulare, sulla base molecolare delle proprietà delle acque termali a livello mondiale, sono limitati. Secondo le informazioni di cui disponiamo, l'Italia rappresenta un caso unico in quanto è particolarmente ricca di sorgenti che condividono gli stessi effetti terapeutici e che hanno caratteristiche termali e saline simili a quelle dell'acqua della sorgente di Nitrodi, probabilmente in considerazione del fatto che l'origine idro-geologica è la stessa. Ad esempio, l'acqua Leopoldina di Montecatini Terme in Toscana esercita effetti anti-infiammatori (46), ed è anche efficace nel trattamento della dermatite atopica, della seborrea e della psoriasi (47). Sarebbe opportuno incoraggiare la ricerca a livello mondiale sui possibili effetti terapeutici di altre sorgenti di acqua calda con contenuto di sale e caratteristiche termali simili.

Anche se l'acqua di Nitrodi è riuscita a promuovere la mobilità e proliferazione della linea cellulare RKO del carcinoma del colon, ha anche indotto la sottoregolazione dell'espressione MMP2, probabilmente tramite l'inattivazione del COX2, per quanto riguarda entrambe le molecole coinvolte nella progressione del cancro, nelle metastasi e nell'infiammazione (48,49). È stato recentemente dimostrato che l'inibitore MMP è in grado di sopprimere la progressione metastatica del cancro (50). Inoltre, l'acqua di Nitrodi effettua la sottoregolazione della proteina S-nitrosilazione che modula la segnalazione delle cellule verso l'infiammazione (51). Era stato

ipotizzato che questi effetti, che potrebbero presentarsi sinergicamente, sono la base molecolare degli effetti benefici che l'acqua di Nitrodi potrebbe esercitare su varie malattie (11).

Il presente studio fornisce risultati preliminari che dovrebbero essere verificati negli studi in vitro eseguiti su linee cellulari non cancerose e in vivo. È necessario svolgere esperimenti aggiuntivi per confermare il ruolo dell'acqua di Nitrodi sulla S-nitrosilazione COX-2, utilizzando il saggio di cambiamento della biotina di S-nitrosilazione per effettuare la precipitazione della proteina nitrosilata e il rilevamento del COX-2 specifico tramite l'analisi Western Blot (52). Prendendo in considerazione l'associazione tra NO e S-nitrosilazione (53), inibitori della sintasi dell'ossido nitrico inducibile, come nel caso dell'estere del N-nitro-L-arginina-metile (L-NAME), devono essere utilizzati in futuro per eseguire un controllo sperimentale negativo. Inoltre, potrebbe essere opportuno che prospettive future in materia di ricerca delle acque termali esaminino più approfonditamente gli effetti protettivi che l'acqua di Nitrodi esercita contro la stimolazione infiammatoria, come nel caso di Il□6, nelle cellule non cancerogene, e che venga esplorato il modello di espressione della citochina a seguito dell'incubazione in vitro nell'acqua di Nitrodi.

Riconoscimenti

Gli autori desiderano ringraziare Jean Ann Gilder (Scientific communication srl, Napoli, Italia), che ha assunto il ruolo di editor del testo. Gli autori desiderano anche ringraziare Giuseppe di Meglio (Fonti delle NinfeNitrodi, via pendio Nitrodi, 80070 Barano d'Ischia; termedinitrodi@gmail.com), che ha fornito l'acqua di Nitrodi.

Finanziamento

Il presente studio è stato finanziato tramite una sovvenzione di FORST-Fondazione per la Ricerca Termale-2018.

Disponibilità dei dati e dei materiali

Tutti i dati generati o analizzati durante questo studio sono inclusi nel presente articolo pubblicato. Durante l'attuale studio, non sono stati generati né analizzati set di dati.

Contributi degli autori

PI, AdP, MdR e FWR hanno partecipato alla concezione e progettazione dello studio. Fc e AA hanno svolto gli esperimenti cellulari e molecolari. MdR ha eseguito l'analisi statistica dei dati. PI e AdP hanno coordinato il lavoro. MdR e FWR hanno contribuito all'interpretazione dei dati e stilato il manoscritto. PI e AdP si sono occupati della revisione critica del manoscritto. PI ha fornito il finanziamento. Tutti gli autori hanno modificato e approvato la versione finale del manoscritto.

Approvazione etica e consenso alla partecipazione

Non pertinente.

Consenso dei pazienti per la pubblicazione

Non pertinente.

Interessi concorrenziali

Gli autori dichiarano di non avere interessi concorrenziali.

Riferimenti

1. Matsumoto S: Evaluation of the role of balneotherapy in rehabilitation medicine. *J Nippon Med Sch* 85: 196-203, 2018.
2. Gálvez I, Torres-Piles S and Ortega-Rincón E: Balneotherapy, immune system, and stress response: A hormetic strategy? *Int J Mol Sci* 19: 1687, 2018.
3. Huang A, Seité S and Adar T: The use of balneotherapy in dermatology. *Clin Dermatol* 36: 363-368, 2018.
4. Andreassi L and Flori L: Mineral water and spas in Italy. *clin Dermatol* 14: 627-632, 1996.
5. Ricciardi E, Ricciardi cA and Ricciardi B: Treatment of kidney diseases in the thermal springs of Pithecusa during the XVIII century. *G Ital Nefrol* 33 (Suppl 66): 33.S66.26, 2016.
6. Forti L: Rilievi dedicati alle ninfe nitrodi. In: *Rendiconti dell'Accademia di Archeologia. Lettere e Belle Arti-Napoli, New Series* 26, pp161-191, 1951.
7. Nasermoaddeli A and Kagamimori S: Balneotherapy in medicine: A review. *Environ Health Prev Med* 10: 171-179, 2005.
8. Petraccia L, Liberati G, Masciullo SG, Grassi M and Fraioli A: Water, mineral waters and health. *Clin Nutr* 25: 377-85, 2006.
9. Marotta and Sica: Classificazione italiana delle acque minerali. *Annali di Chimica Applicata* 19: 1929.
10. Marotta and Sica: Classificazione italiana delle acque minerali. *Annali di Chimica Applicata* 23: 1933.
11. Manciola M: *Le proprietà terapeutiche delle acque Nitrodi e Olmitello*. Li Causi Editore, Bologna, 1984.
12. Yuan H, Liddle FJ, Mahajan S and Frank dA: IL-6-induced survival of colorectal carcinoma cells is inhibited by butyrate through down-regulation of the IL-6 receptor. *carcinogenesis* 25: 2247-2255, 2004.
13. Unver N and McAllister F: IL-6 family cytokines: Key inflam- matory mediators as biomarkers and potential therapeutic targets. *Cytokine Growth Factor Rev* 41: 10-17, 2018.
14. Turano M, costabile V, cerasuolo A, duraturo F, Liccardo R, delrio P, Pace U, Rega d, dodaro cA, Milone M, et al: characterisation of mesenchymal colon tumour-derived

cells in tumourspheres as a model for colorectal cancer progression. *Int J Oncol* 53: 2379-2396, 2018.

15. cammarota F, conte A, Aversano A, Muto P, Ametrano G, Riccio P, Turano M, Valente V, delrio P, Izzo P, et al: Lithium chloride increases sensitivity to photon irradiation treatment in primary mesenchymal colon cancer cells. *Mol Med Rep* 21: 1501-1508, 2020.

16. Galatola M, Paparo L, duraturo F, Turano M, Rossi GB, Izzo P and de Rosa M: Beta catenin and cytokine pathway dysregulation in patients with manifestations of the 'PTEN hamartoma tumor syndrome'. *BMC Med Genet* 13: 28, 2012.

17. costabile V, duraturo F, delrio P, Rega d, Pace U, Liccardo R, Rossi GB, Genesio R, Nitsch L, Izzo P and de Rosa M: Lithium chloride induces mesenchymal to epithelial reverting transition in primary colon cancer cell cultures. *Int J Oncol* 46: 1913-1923, 2015.

18. Wink dA, Kim S, coffin d, cook Jc, Vodovotz Y, chistodoulou d, Jourd'heuil d and Grisham MB: detection of S-nitrosothiols by fluorometric and colorimetric methods. In *Methods Enzymol* 301: 201-211, 1999.

19. Nasermoaddeli A and Kagamimori S: Balneotherapy in medicine: A review. *Environ Health Prev Med* 10: 171-179, 2005.

20. Ortega E, Gálvez I, Hinchado Md, Guerrero J, Martín-cordero L and Torres-Piles S: Anti-inflammatory effect as a mechanism of effectiveness underlying the clinical benefits of pelotherapy in osteoarthritis patients: Regulation of the altered inflammatory and stress feedback response. *Int J Biometeorol* 61: 1777-1785, 2017.

21. Galvez I, Torres-Piles S, d Hinchado M, Alvarez-Barrientos A, Torralbo-Jimenez P, Guerrero J, Martin-cordero L and Ortega E: Immune-neuroendocrine dysregulation in patients with osteoarthritis: A revision and a pilot study. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 17: 78-85, 2017.

22. Matz H, Orion E and Wolf R: Balneotherapy in dermatology. *dermatol Ther* 16: 132-140, 2003.

23. Ehrenfeld P, cordova F, duran WN and Sanchez FA: S-nitrosylation and its role in breast cancer angiogenesis and metastasis. *Nitric Oxide* 87: 52-59, 2019.

24. Iwakiri Y, Satoh A, chatterjee S, Toomre dK, chalouni cM, Fulton d, Groszmann RJ and Sessa Wc: Nitric oxide synthase generates nitric oxide locally to regulate compartmentalized protein S-nitrosylation and protein trafficking. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 19777-19782, 2006.

25. Marín N, Zamorano P, carrasco R, Mujica P, González FG, Quezada c, Meininger cJ, Boric MP, durán WN and Sánchez FA: S-Nitrosation of β -catenin and p120 catenin: A novel regulatory mechanism in endothelial hyperpermeability. *circ Res* 111: 553-563, 2012.

26. Guequén A, carrasco R, Zamorano P, Rebolledo L, Burboa P, Sarmiento J,

Boric MP, Korayem A, Durán WN and Sánchez FA: S-nitrosylation regulates VE-cadherin phosphorylation and internalization in microvascular permeability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 310: H1039-H1044, 2016.

27. Stamler JS, Simon DI, Jaraki O, Osborne JA, Francis S, Mullins M, Singel D and Loscalzo J: S-nitrosylation of tissue-type plasminogen activator confers vasodilatory and antiplatelet properties on the enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 8087-8091, 1992.

28. Rizi BS, Achreja A and Nagrath D: Nitric oxide: The forgotten child of tumor metabolism. *Trends in cancer* 3: 659-672, 2017.

29. Foster MW, Hess DT and Stamler JS: Protein S-nitrosylation in health and disease: A current perspective. *Trends Mol Med* 15: 391-404, 2009.

30. Nakamura T and Lipton SA: 'SNO'-storms compromise protein activity and mitochondrial metabolism in neurodegenerative disorders. *Trends Endocrinol Metab* 28: 879-892, 2017.

31. Narne P, Pandey V and Phanithi PB: Role of nitric oxide and hydrogen sulfide in ischemic stroke and the emergent epigenetic underpinnings. *Mol Neurobiol* 56: 1749-1769, 2019.

32. Plenchette S: Role of S-nitrosylation in the extrinsic apoptotic signalling pathway in cancer. *Redox Biol* 5: 415, 2015.

33. Wei W, Li B, Hanes MA, Kakar S, Chen X and Liu L: S-nitrosylation from GSNOR deficiency impairs DNA repair and promotes hepatocarcinogenesis. *Sci Transl Med* 2: 19ra13, 2010.

34. Liu C, Liang MC and Soong TW: Nitric oxide, iron and neurodegeneration. *Front Neurosci* 13: 114, 2019.

35. Spiers JG, Chen HJ, Bourgognon JM and Steinert JR: Dysregulation of stress systems and nitric oxide signaling underlies neuronal dysfunction in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 134: 468-483, 2019.

36. García-Ortiz A and Serrador JM: Nitric oxide signaling in T cell-mediated immunity. *Trends Mol Med* 24: 412-427, 2018.

37. Kim SF, Huri DA and Snyder SH: Inducible nitric oxide synthase binds, S-nitrosylates, and activates cyclooxygenase-2. *Science* 310: 1966-1970, 2005.

38. Alexanian A and Sorokin A: Cyclooxygenase 2: Protein-protein interactions and posttranslational modifications. *Physiol Genomics* 49: 667-681, 2017.

39. Guan PP, Ding WY and Wang P: The roles of prostaglandin F₂ in regulating the expression of matrix metalloproteinase-12 via an insulin growth factor-2-dependent mechanism in sheared chondrocytes. *Signal Transduct Target Ther* 3: 27, 2018.

40. Goldring MB: Osteoarthritis and cartilage: The role of cytokines. *Curr Rheumatol Rep* 2: 459-465, 2000.

41. Basu S, Whiteman M, Matthey D and Halliwell B: Raised levels of F(2)-

isoprostanes and prostaglandin F(2alpha) in different rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 60: 627-631, 2001.

42. Fioravanti A, Karagülle M, Bender T and Karagülle MZ: Balneotherapy in osteoarthritis: Facts, fiction and gaps in knowledge. *Eur J Integr Med* 9: 148-150, 2017.

43. Jantz MA and Antony VB: Pathophysiology of the Pleura. *Respiration* 75: 121-133, 2008.

44. Prandelli c, Parola c, Buizza L, delbarba A, Marziano M, Salvi V, Zacchi V, Memo M, Sozzani S, calza S, et al: Sulphurous thermal water increases the release of the anti-inflammatory cytokine IL-10 and modulates antioxidant enzyme activity. *Int J Immunopathol Pharmacol* 26: 633-646, 2013.

45. Karagülle MZ, Karagülle M, Kılıç S, Sevinç H, Dündar C and Türkoğlu M: In vitro evaluation of natural thermal mineral waters in human keratinocyte cells: A preliminary study. *Int J Biometeorol* 62: 1657-1661, 2018.

46. Tsourelis-Nikita E, Menchini G, Ghersetich I and Hercogova J: Alternative treatment of psoriasis with balneotherapy using Leopoldine spa water. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 16: 260-262, 2002.

47. Augustin M, Alvaro-Gracia JM, Bagot M, Hillmann O, van de Kerkhof PCM, Kobelt G, Maccarone M, Naldi L and Schellekens H: A framework for improving the quality of care for people with psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 26 (Suppl 4): S1-S16, 2012.

48. de Jager SC and Hoefler IE: Beyond the matrix: MMP2 as critical regulator of inflammation-mediated vascular dysfunction. *Cardiovasc Res* 113: 1705-1707, 2017.

49. Fingleton B: Matrix metalloproteinases as regulators of inflammatory processes. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1864: 2036-2042, 2017.

50. Lyu Y, Xiao Q, Yin L, Yang L, Wei H and He W: Potent delivery of an MMP inhibitor to the tumor microenvironment with thermosensitive liposomes for the suppression of metastasis and angiogenesis. *Signal Transduct Target Ther* 4: 26, 2019.

51. Dasgupta S, Gomez JJ, Singh I and Khan M: S-Nitrosylation in regulation of inflammation and cell damage. *Curr Drug Targets* 19: 1831-1838, 2018.

52. Forrester MT, Foster MW, Benhar M and Stamler JS: detection of protein S-nitrosylation with the biotin-switch technique. *Free Radical Bio Med* 46: 119-126, 2009.

53. Martínez-Ruiz A, Cadenasa S and Lamas S: Nitric oxide signaling: classical, less classical, and nonclassical mechanisms. *Free Radical Bio Med* 51: 17-29, 2011.



Questo lavoro viene rilasciato in licenza ai sensi di una Licenza "Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0)".