



Dipartimento di Biologia  
Università di Padova



*Consiglio Nazionale delle Ricerche*

Istituto di Biofisica CNR  
Pisa



## Società Italiana di Fotobiologia

*Sezione Nazionale della International Union for Photobiology*

Congresso Annuale  
Residenza Università di Padova  
Bressanone (BZ), 16 – 18 Giugno 2005

Programma  
Riassunti delle comunicazioni

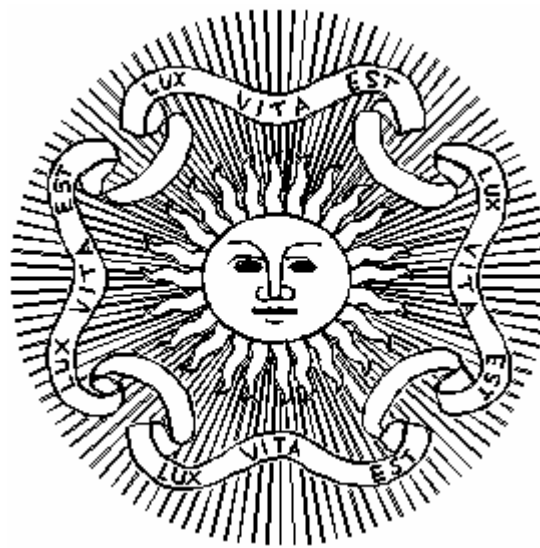


Dipartimento di Biologia  
Università di Padova



*Consiglio Nazionale delle Ricerche*

Istituto di Biofisica CNR  
Pisa



## Società Italiana di Fotobiologia

*Sezione Nazionale della International Union for Photobiology*

Congresso Annuale  
Residenza Università di Padova  
Bressanone (BZ), 16 – 18 Giugno 2005

# Programma

## Riassunti delle comunicazioni

## **Comitato Scientifico**

**Giovanni Bottioli**

Istituto di Genetica Molecolare CNR, Sezione Istochimica e Citometria, Pavia

**Sergio Caffieri**

Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Padova

**Gianfranco Canti**

Dipartimento di Farmacologia, Università di Milano

**Pietro Cappugi**

Dipartimento di Scienze Dermatologiche, Università di Firenze

**Donatella Carbonera**

Dipartimento di Chimica, Università di Padova

**Franco Fusi**

Dipartimento di Fisiopatologia Clinica, Università di Firenze

**Francesco Ghetti**

Istituto di Biofisica CNR, Pisa

**Giuseppe Palumbo**

Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare,  
Università di Napoli *Federico II*

**Antonella Sgarbossa**

Istituto di Biofisica CNR, Pisa

## **Segreteria Scientifica ed Organizzativa**

**Giovanni Checcucci, Francesco Ghetti, Antonella Sgarbossa**

Istituto di Biofisica CNR, Pisa

**Giulio Jori**

Dipartimento di Biologia, Università di Padova

Per informazioni: **Francesco Ghetti**

Consiglio Nazionale delle Ricerche

Area della Ricerca di Pisa

Via G. Moruzzi 1, 56124 PISA

Tel: 050 3152764, Fax: 050 3152760, E-mail: francesco.ghetti@pi.ibf.cnr.it

*Il Congresso è organizzato con il contributo di*

*Università degli Studi di Padova*

*Comune di Bressanone (BZ)*



# PROGRAMMA

## Giovedì 16 Giugno

16.00 **Apertura del Congresso**

16.15 **In memoria di Laura Polo**

**Conferimento del Premio “Laura Polo” per una tesi di laurea di argomento fotobiologico**

16.30 **Comunicazione orale del vincitore del Premio “Laura Polo”**

**M. Mozzo**, T. Morosinotto, R. Bassi, R. Croce (Verona; Trento; Marseille, F)

L'origine delle forme spettrali a bassa energia del fotosistema I: analisi mutazionale delle proteine antenna LHCI delle piante superiori

Chairperson: **G. Palumbo** (Napoli)

17.00 **A. Diaspro** (Genova)

Journey to the centre of the cell: two-photon interactions from spectral imaging to single molecule photodynamics (*pag. 13*)

17.50 **A. Sgarbossa**, D. Buselli, F. Lenci (Pisa)

Sonde fluorescenti per il monitoraggio degli stati di aggregazione di peptidi neurotossici (*pag. 14*)

18.10 **S. Vianello**, S. Gobbo, G. Jori, V. Petronilli, F. Ricchelli (Padova)

Localizzazione dell'ematoporfirina nel complesso del poro di transizione di permeabilità mitocondriale (*pag. 15*)

18.30 **Welcome reception**

## Venerdì 17 Giugno

Chairperson: **F. Lenci** (Pisa)

- 9.00 **F. Beltram** (Pisa)  
Green fluorescent protein design for single-molecule applications in biology and bioelectronics (*pag. 16*)
- 9.50 **R. Bizzarri**, C. Arcangeli, D. Arosio, F. Beltram (Pisa)  
A novel green fluorescent protein mutant as improved ratiometric excitation or emission pH biosensor (*pag. 17*)
- 10.10 **V. Basile**, S. Ambrosini, G. Vannelli, F. Rossi, R. Pini, L. Menabuoni, R. Pratesi, M. Monici (Firenze)  
Monitoraggio della riparazione del tessuto corneale mediante Microscopia di Autofluorescenza ad Immagini Multispettrali (MIAM) (*pag. 18*)
- 10.30 **A.C. Croce**, U. Cillo, U. Bareato, D. Neri, I. Freitas, G. Bottiroli (Pavia; Padova)  
Caratterizzazione di autofluorescenza di fegato steatotico umano (*pag. 19*)
- 10.50 **Coffee break**

Chairperson: **R. Pratesi** (Firenze)

- 11.20 **M. Blumthaler** (Innsbruck, A)  
Solar UV exposure in the alpine region (*pag. 20*)
- 12.10 **G. Miolo**, F. Gallochio, S. Caffieri, F. Baccichetti, C. Marzano, M.G. Zanirato, G. Beyersbergen van Henegouwen (Padova)  
Fototossicità del betametassone: studi *in vitro*, *in vivo* ed *ex vivo* (*pag. 21*)
- 12.30 **M. Camerin**, S. Rello, A. Villanueva, M. Rodgers, G. Jori (Padova; Madrid, E; Bowling Green, USA)  
Utilizzo di metallo-naftalocianine come efficaci agenti fototerapeutici (*pag. 22*)

## Venerdì 17 Giugno

Chairperson: **G. Canti** (Milano)

14.30 **H. Kostron** (Innsbruck, A)

Photodynamic applications in neurosurgery (*pag. 23*)

15.20 **E. Friso**, L. Borsetto, G. Roncucci, D. Dei, P. Colautti, G. Jori (Padova; Firenze)

Utilizzo di una boroftalocianina come agente antitumorale foto- e radio-sensibilizzante nella terapia combinata PDT-BNCT (*pag. 24*)

15.40 **L. Mavilia**, P. Cappugi, R. Rossi, M. Mori, E.F. Reali, P. Campolmi, T.M. Lotti (Firenze)

Terapia fotodinamica nella terapia delle cheratosi attiniche e dei carcinomi a cellule basali (*pag. 25*)

16.00 **Coffee break**

16.30 **Sessione poster**

17.00 **Discussione poster**

Chairperson: **G. Jori** (Padova)

17.30 **Assemblea dei Soci**

20.00 **Cena sociale**



## Sabato 18 Giugno

Chairperson: **F. Ghetti** (Pisa)

- 9.00 **F. Fusi** (Firenze)  
Low-cost microscopy: ovvero l'arte di arrangiarsi (*pag. 26*)
- 9.50 **G. Romano**, V. Basile, L. Mercatelli, A. Conti, F. Fusi (Firenze)  
Misura del profilo di intensita' di un fascio di eccitazione UV con l'uso del film radiocromico GAFCHROMIC™ (*pag. 27*)
- 10.10 **A. Salvador**, E. Fortunato, D. Vedaldi, F. Dall'Acqua, P. Barraja, G. Cirrincione, G. Viola (Padova; Palermo)  
Apoptosis induction in HL-60 leukemia cells by photoexcited tiopyrano[2,3-e]indol-2-ones (*pag. 28*)
- 10.30 **Coffee break**
- 11.00 **S. Ferro**, O. Coppellotti, G. Roncucci, G. Jori, T. Ben Amor (Padova; Firenze; Gafsa, TN)  
Photosensitization of pathogenic protozoa in trophozoitic and cystic stages (*pag. 29*)
- 11.20 **A. Faccio**, F. Dall'Acqua, D. Vedaldi, H. Ihmels, A. Granzham, G. Viola (Padova; Siegen, D)  
DNA binding and DNA photocleaving properties of penta and hexacyclic derivatives of quinolizinium ion (*pag. 30*)
- 11.40 T. Ben Amor, H. Alimi, N. Ben Amor, M. Magaraggia, **G. Jori** (Gafsa, TN; Padova)  
Combined effect of Haematoporphyrin and CaCl<sub>2</sub> on *Escherichia coli* in waste waters from the Aguila water treatment station in Southern Tunisia (*pag. 31*)
- 12.00 **Chiusura lavori**

## Sessione Poster

**F. Bettio**, C. Marzano, F. Baccichetti, F. Bordin (Padova)

Risposta cellulare al danno fotoindotto nel DNA da lomefloxacin (pag. 32)

**S. Ferro**, F. Ricchelli, G. Mancini, G. Jori (Padova; Roma)

Liposomi cationici per l'inattivazione di batteri gram positivi (pag. 33)

**L. Fulgentini**, V. Passini, R. Marangoni, D. Gioffrè, A. La Terza, C. Miceli, G. Colombetti (Pisa; Camerino)

Risposta all'irraggiamento UVB nel ciliato antartico *Euplotes focardii* studiata attraverso l'analisi dell'espressione dei geni HSP70 (pag. 34)

**A. Leonini**, A. Ettore, M. Andreassi, L. Taurisano, A. Di Stefano (Siena)

ROS generation, reduction of mitochondrial transmembrane potential and protein carbonylation in apoptosis induced by solar ultraviolet radiation in human HACAT keratinocytes (pag. 35)

**M. Mozzo**, T. Morosinotto, R. Bassi, R. Croce (Trento; Verona; Marseille, F)

Inside the structure of LHCA 3 by mutational analysis (pag. 36)

**M. Magaraggia**, F. Faccenda, L. Pontalti, M. Komjanc, G. Jori, T. Ben Amor (Padova; Trento; Gafsa, TN)

Disinfection of water from trout farming pools affected by saprolegniosis through the combined action of porphyrins and visible light (pag. 37)



# Riassunti delle comunicazioni



**JOURNEY TO THE CENTRE OF THE CELL: TWO-PHOTON INTERACTIONS FROM SPECTRAL  
IMAGING TO SINGLE MOLECULE PHOTODYNAMICS**

**Alberto Diaspro**

INFM-LAMBS, MicroScoBio Research Center, Department of Physics,  
University of Genoa, Via Dodecaneso, 33 16146 Genoa Italy  
e-mail: [diaspro@fisica.unige.it](mailto:diaspro@fisica.unige.it) URL: <http://www.lambs.it>

In optical microscopy the offer is now for almost 5D: from 3D to time until spectral information. In particular, the advent of two-photon excitation (2PE) of fluorescence has led to terrific advances in the study of biological systems down to single molecule imaging. As well, 2PE is particularly relevant for the study of the 3D and dynamic properties of biological molecules within their natural environment, cells or tissues. In particular the advent of 2PE mitigates overall photobleaching and phototoxicity problems, opening new perspectives by providing new attractive advantages with respect to the companion confocal 3D microscopy. In particular the confinement of the volume of event within a subfemtoliter capacity makes this excitation modality a sort of discrete voyager into the intricate and complex world of the biological cell. A two-photon shuttle in the centre of the cell. Optical schemes and architectures for 2PE from microscopic level to single molecule imaging will be discussed keeping in mind applications in cell biophysics. Examples of three-dimensional and multiple fluorescence imaging from cells as well as from subresolution objects and single fluorescent molecules will be given. Recent results in the utilization of confocal and 2PE for specific GFP switching at single molecule level and for monitoring of 2PE uncaging will be shown. Furthermore, an effective nanostructured system for confining molecules will be introduced. This method allows refining studies on fluorescent properties of molecules in terms of FRAP, FLIM, FRET and other photophysical parameters useful for the comprehension of the delicate relationship between structure and function in biological systems. SHG signals will be discussed, too.

Diaspro A. (ed.) (2002) Confocal and two-photon microscopy. Wiley-Liss, New York.

**SONDE FLUORESCENTI PER IL MONITORAGGIO  
DEGLI STATI DI AGGREGAZIONE DI PEPTIDI NEUROTOSSICI**

**Antonella Sgarbossa, Dario Buselli e Francesco Lenci**

Istituto di Biofisica, Sezione di Pisa, CNR, Italia

In diverse patologie neurodegenerative si osservano nel tessuto cerebrale depositi di aggregati proteici, dalla morfologia fibrillare e con struttura predominante di tipo  $\beta$ -sheet, insolubili in solventi e detergenti comuni, resistenti alle proteasi. Nel morbo di Alzheimer, in particolare, detti aggregati sono normalmente osservati sotto forma di placche senili e depositi di fibrille extracellulari formati dalla polimerizzazione dei peptidi  $\beta$ -amiloidi (1-40) e (1-42). Molto dibattuto è il problema di quale sia la forma citotossica patologica (oligomero intermedio o fibrilla matura) così come il suo meccanismo d'azione (alterazione della membrana cellulare). Quindi, la comprensione delle basi molecolari del processo di aggregazione dei peptidi  $\beta$ -amiloidi, a tutt'oggi argomento di indagine e discussione, oltre a permettere significativi avanzamenti delle conoscenze, può contribuire alla messa a punto di inibitori e/o bloccanti di potenziale efficacia terapeutica e preventiva. La tioflavina T è un colorante comunemente impiegato per rivelare la presenza di depositi fibrillari, grazie alle peculiari modifiche delle sue proprietà spettroscopiche causate dall'interazione con le strutture di tipo  $\beta$ -sheet degli aggregati amiloidi. In particolare, se eccitata a 440-450 nm, fluoresce a circa 480 nm solo in presenza di fibrille, mentre non fluoresce quando il peptide è nella forma monomerică o oligomerică. In questo lavoro è stato fatto uno studio comparativo delle proprietà spettroscopiche della tioflavina T e dell'ipericina come sonde fluorescenti per il monitoraggio degli stati di aggregazione del peptide  $\beta$ -amiloidi (1-40).

## LOCALIZZAZIONE DELL'EMATOPORFIRINA NEL COMPLESSO DEL PORO DI TRANSIZIONE DI PERMEABILITÀ MITOCONDRIALE

**Sara Vianello<sup>1</sup>**, Silvano Gobbo<sup>1</sup>, Giulio Jori<sup>1</sup>,  
Valeria Petronilli<sup>2</sup> e Fernanda Ricchelli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto di Tecnologie Biomediche-CNR/Dip. di Biologia-Univ.di Padova

<sup>2</sup>Istituto di Neuroscienze-CNR /Dip. di Scienze Biomediche-Univ. di Padova.

Il microintorno dell'ematoporfirina (HP) nei mitocondri è sensibile alle variazioni conformazionali del poro di transizione di permeabilità mitocondriale (MPTP), un complesso proteico coinvolto in vari tipi di morte cellulare. Questa sensibilità sembra dovuta a una localizzazione strategica di HP in costituenti del poro. Essa si riflette in variazioni di anisotropia della sonda in seguito all'apertura di MPTP e in una fotodegradazione selettiva di domini funzionali del poro dopo irradiazione. Dati di letteratura sostengono l'assunzione di una distribuzione preferenziale di HP in proteine di MPTP. In particolare, le porfirine dicarbossiliche rappresentano i legandi endogeni predominanti del recettore periferico mitocondriale per le benzodiazepine (PBR), con costante di inibizione dell'ordine di nanomolare ( $K_i^{HP} \sim 500$  nM). L'associazione fisica e funzionale di PBR con il voltage-dependent anion channel (VDAC) della membrana mitocondriale esterna e con il carrier ADP/ATP (ANT) della membrana interna suggerisce che l'intero complesso PBR-VDAC-ANT può interagire con la porfirina. A sua volta, il complesso PBR-VDAC-ANT è fortemente candidato come partecipante della struttura o della regolazione di MPTP. Esperimenti tesi a chiarire la natura del microintorno di HP indicano che i due fenomeni correlati a MPTP, cioè le variazioni di anisotropia della sonda durante l'apertura del poro e l'inibizione della transizione di permeabilità in seguito a irradiazione, sono da imputare a siti distinti di legame della HP all'interno del complesso PBR-VDAC-ANT. In particolare, il primo fenomeno riguarda un sito di legame di HP su PBR, in quanto le variazioni di anisotropia di HP durante l'apertura di MPTP non si osservano in presenza di FGIN-1 (derivato dell' indolacetamide), un potente legando specifico di PBR. Esperimenti di fotoossidazione in presenza di un reagente delle istidine (His), il dietil pirocarbonato (DEPC), indicano che il secondo sito di legame di HP comprende specifiche His che regolano la propensione del poro all'apertura e che sono probabilmente localizzate sul carrier ADP/ATP.



**GREEN FLUORESCENT PROTEIN DESIGN FOR SINGLE-MOLECULE APPLICATIONS  
IN BIOLOGY AND BIOELECTRONICS**

**Fabio Beltram**

NEST-INFM and Scuola Normale Superiore, Pisa, Italy

I shall present recent results on the molecular design and optical characterization of fluorescent tags of the green-fluorescent-protein class engineered to yield high efficiency and optically- or environment-controllable probes that maintain full compatibility with human-cell expression. Improved performance will be shown in terms of photostability and pH (in)sensitivity. The application of these fluorescent tags to intracellular pH sensing, protein trafficking and interactions will be shown in FRET and FRAP studies *in vivo* for the case of Tat, the HIV-1 transactivator.

I shall also show that such improved molecules are ideally suitable for the realization of ultra-dense optical storage architectures where memory-cell size can be reduced to the ultimate single-molecule limit.

Work performed in collaboration with: D. Arosio, R. Bizzarri, F. Cardarelli, G. Chirico, A. Ferrari, M. Giacca, A. Marcello, R. Nifosì, V. Pellegrini, F. Ricci, W. Rocchia, V. Tozzini

R. Cinelli *et al.* Phys. Rev. Lett. **86**, 3439 (2001), Appl. Phys. Lett. **79**, 3353 (2001)

A. Marcello *et al.* J. Biol. Chem. **276**, 39220 (2001)

V. Tozzini *et al.* J. Phys. Chem. **107**, 1679 (2003)

R. Nifosì *et al.* J. Phys. Chem. **107**, 1679 (2003)

A. Marcello *et. al* EMBO J. **22**, 2156 (2003)

A. Ferrari *et al.* Mol. Ther. **8**, 284 (2003)

A. Fittipaldi *et al.* Mol. Ther. **9**, 365 (2004)

G. Chirico *et al.* Phys. Rev. E **70**, 030901 (2004)

G. Chirico *et al.* Chem. Phys. Chem. **6**, 328 (2005)

## A NOVEL GREEN FLUORESCENT PROTEIN MUTANT AS IMPROVED RATIOMETRIC EXCITATION OR EMISSION pH BIOSENSOR

Ranieri Bizzarri, Caterina Arcangeli, Daniele Arosio, Fabio Beltram

NEST-INFM, Scuola Normale Superiore, via della Faggiola 19 Pisa, Italy

Intracellular pH is an important modulator of cell function, as the activity of most protein is affected by small changes of the proton concentration. In spite of the fast diffusion of the H<sup>+</sup> ion, the cellular distribution of pH is not uniform, being dependent of the cell microdomain [1]. Hence, protein-based fluorescent pH biosensors appear more advantageous than organic indicators, as they can be selectively targeted to subcellular compartments by genetic engineering. Due to its photophysical characteristics, the class of Green Fluorescent Proteins (GFP) stands as naturally optimized structure for fluorescent probing of environmental pH [2]. However, the development of ratiometric probes, which display multiple excitation or emission maxima with opposite dependence on pH, appears the only way to address the problem of variable cellular expression. Although some GFP-based ratiometric pH biosensors have been reported, most are not optimized for the physiological pH range of the cellular processes or rely upon FRET couples whose control is difficult to achieve [2-3].

As a part of a long-standing interest in the biophysics of GFP mutants [4], we developed a ratiometric pH biosensor, called E<sup>2</sup>GFP, which shows an optimized working range between 6 and 8. E<sup>2</sup>GFP shows a dependence of absorption and emission spectra on pH relevant to a single titration step, whose pK=7. More, E<sup>2</sup>GFP allows the selection of the proper excitation line (in the range 400-500 nm) or emission interval (in the range 480-600 nm) to obtain a ratiometric signal dependent only on the pH value with a modulable dynamic range. The presence of anions known to bind reversibly to E<sup>2</sup>GFP, such as chloride, was demonstrated not to affect the emission-*vs*-pH absolute calibration curve. A photophysical model was developed by our group to explain the experimental results obtained *in vitro* and *in vivo*. The biosensor was used to monitor the intracellular pH in living cells under different physiological conditions. The biosensor was also expressed as a fusion protein E<sup>2</sup>GFP-Tat, thus allowing the selective nucleolar or nuclear targeting of the pH-probe.

[1] A. Roos, W. F. Boron, *Physiol. Rev.* **61** (1981) 296-434

[2] G. T. Hanson, et al., *Biochemistry* **41** (2002) 15477-88

[3] S. T. Hess, et al., *J. Phys. Chem. B* **108** (2004) 10138-10148

[4] R. Bizzarri, et al., *Macromol. Symp.* **218** (2004) 283-282

## MONITORAGGIO DELLA RIPARAZIONE DEL TESSUTO CORNEALE MEDIANTE MICROSCOPIA DI AUTOFLUORESCENZA AD IMMAGINI MULTISPETTRALI (MIAM)

V. Basile<sup>1</sup>, S. Ambrosini<sup>2</sup>, G. Vannelli<sup>2</sup>, F. Rossi<sup>3</sup>, R. Pini<sup>3</sup>, L. Menabuoni<sup>4</sup>,  
R. Pratesi<sup>5</sup>, M. Monici<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Fisiopatologia Clinica-Sez. Fisica Medica, Università di Firenze

<sup>2</sup>Dipartimento di Anatomia, Istologia e Medicina Legale, Università di Firenze

<sup>3</sup>Istituto di Fisica Applicata "Nello Carrara"-C.N.R., Firenze

<sup>5</sup>Casa di Cura Villa Donatello, Firenze

<sup>6</sup>CEO-Centro di Eccellenza Optronica, Firenze

Nel campo della chirurgia oftalmica le tecniche di saldatura laser del tessuto corneale suscitano crescente interesse, poiché rispetto alle tradizionali procedure di sutura, determinano un migliore e più rapido processo di riparazione dello stroma corneale.

In questo studio è stata utilizzata la tecnica di Microscopia di Autofluorescenza ad Immagini Multispettrali (MIAM) per valutare il processo di riparazione del tessuto corneale dopo sutura con due tecniche chirurgiche (di cui una è la convenzionale sutura, l'altra è la saldatura della cornea eseguita mediante radiazione laser, dopo applicazione di un cromoforo che amplifica localmente l'assorbimento ottico).

La tecnica MIAM ha permesso di monitorare il processo di riparazione del tessuto corneale dopo intervento chirurgico, fornendo informazioni complementari alle tecniche istochimiche standard. La tecnica MIAM è estremamente indicata per lo studio del tessuto corneale, poiché esso è costituito in gran parte da fibrille di collagene, che è uno dei principali fluorofori endogeni presente nei tessuti.

L'analisi di autofluorescenza è stata effettuata su sezioni biotiche di tessuti corneali di coniglio sottoposti a sutura o a saldatura laser *in vivo* ed espantati a tempi crescenti dopo l'intervento.

I risultati preliminari da noi ottenuti dimostrano che:

- La sutura laser consente, rispetto a quella tradizionale, di ottenere una più rapida riparazione del tessuto corneale e una migliore riorganizzazione dell'architettura fibrillare, come documentata dalle immagini di microscopia ottenute con la tecnica MIAM.
- Le tecniche di autofluorescenza rappresentano quindi un nuovo approccio per descrivere i processi riparativi del tessuto corneale.

## CARATTERIZZAZIONE DI AUTOFLUORESCENZA DI FEGATO STEATOTICO UMANO

AnnaCleta Croce<sup>1</sup>, Umberto Cillo<sup>2</sup>, Umberto Bareato<sup>2</sup>,  
Daniele Neri<sup>2</sup>, Isabel Freitas<sup>1</sup>, Giovanni Bottioli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Sezione Istochimica e Citometria, IGM-CNR, Dipartimento di Biologia Animale,  
Università di Pavia, Pavia;

<sup>2</sup>I Dipartimento di Chirurgia Generale, Università di Padova, Padova

Il crescente divario tra il numero di organi richiesti e quelli disponibili porta all'accettazione di fegati "marginali", tra i quali in modo particolare quelli con grado di steatosi  $\leq 30\%$  della massa epatica. La steatosi epatica consiste nell'accumulo di lipidi ed è di regola associata a diversi stati patologici (diabete, obesità), all'abuso di alcol e di farmaci. Nel trapianto di fegato, il rischio di insuccesso è direttamente correlato al grado di steatosi dell'organo del donatore. Attualmente la diagnosi di steatosi può essere accertata solo dall'esame istologico di biopsie, per cui risulta particolarmente sentita la necessità di un metodo di diagnosi semplice, applicabile in tempo reale, per una selezione adeguatamente veloce dei fegati potenzialmente disponibili. L'autofluorescenza, per la correlazione delle sue proprietà con le caratteristiche morfofunzionali dei tessuti (fegato compreso), rappresenta un potenziale parametro utile per lo sviluppo di tecniche diagnostiche *in situ*, in tempo reale, del grado di steatosi epatica. Il presente studio è stato condotto su biopsie di fegato ottenute durante intervento chirurgico, congelate in azoto liquido e conservate a  $-80^{\circ}\text{C}$  fino al momento dell'analisi. Ogni biopsia è stata divisa in due parti da utilizzare rispettivamente per: i) allestimento di sezioni al criostato per analisi istologica convenzionale (colorazione H&E), analisi microspettrofluorimetrica e imaging di autofluorescenza; ii) analisi spettrofluorimetrica via singola fibra ottica, inserita direttamente nel tessuto (exc. = 366 nm). I quadri di autofluorescenza delle sezioni di fegato steatotico hanno mostrato differenze rispetto a quelli del parenchima normale per quanto riguarda gli aspetti distribuzionali (scomparsa della reticolina, intensa emissione degli accumuli di lipidi), la forma spettrale di emissione (incremento relativo delle ampiezze a lunghezze d'onda maggiori) e la particolare sensibilità all'irraggiamento. L'analisi via fibra ottica ha confermato la presenza di analogo comportamento a livello di "bulk tissue", con una variabilità intra- e inter-organo da porre in relazione alla distribuzione tipicamente zonale di accumulo di lipidi. Tra i possibili parametri di autofluorescenza, la risposta all'esposizione alla luce di eccitazione (cinetica di fotodecomposizione) appare particolarmente promettente per una applicazione diagnostica.

(COFIN2005; CNR-Special Project. *Biotechnology*)

## **SOLAR UV EXPOSURE IN THE ALPINE REGION**

**Mario Blumthaler**

Div. for Biomedical Physics, Innsbruck Medical University, Austria

The level of solar UV irradiance at the earth's surface is much more variable than the level of visible light. Therefore the knowledge of the various parameters and their influence on UV irradiance is important for estimation of the risk associated with exposure to solar UV irradiance. Due to the combination of several parameters, the Alps are the area with highest UV levels in Europe.

Considering first the situation of cloudless skies, the most important parameters are – in the order of their significance – the solar elevation, the ozone content of the atmosphere, the amount and type of aerosols, the altitude above sea level and the albedo (reflectivity) of the surrounding. Solar elevation is determined by the geographic coordinates and by date and time of measurements. UV-levels are much more concentrated around the time of maximal solar elevation (during the day and during the year) than visible radiation, which is the most important point to consider in order to avoid overexposure. The total ozone content has for each latitude a typical annual cycle, but it can vary in addition on a short time scale by more than 30% within a few days. Furthermore, the global ozone levels were reduced in the past decades due to trace gases in the stratosphere, leading also to the annual formation of the ozone hole in Antarctica. Aerosols in the troposphere lead to a reduction of UV irradiance, but depending on the type of the aerosols, a large part of the attenuation of the direct beam can be converted into enlarged diffuse irradiance. Especially in Alpine regions, usually the amount of aerosols is low, and therefore the UV irradiance is relatively high. The higher the altitude of the measurement station is, the higher is the irradiance, where the increase with altitude is for UV irradiance about double that much compared with visible irradiance. Finally, the albedo of the surrounding can lead to an increase of irradiance, if the ground is highly reflecting. This effect is the strongest at around 320 nm, leading to especially enlarged UV irradiance. This is usually the case for snow covered terrain, and therefore again in Alpine regions in wintertime or at higher altitudes UV irradiance is further enlarged.

Besides these parameters for cloudless conditions, clouds will generally attenuate the irradiance in a very variable way, depending on type and amount of clouds. For UV irradiance this attenuation is less than for visible irradiance, so the visual impression of lower irradiance under clouds is somewhat misleading and still high UV exposure may occur. In special situations, when clouds are near the sun, but they do not obscure the sun itself, it may happen for short time periods that the irradiance is enhanced by up to 20%.

In summary, the solar UV exposure in the Alpine region is strongly variable and the maximal levels are the highest in Europe.

## FOTOTOSSICITA' DEL BETAMETASONE: STUDI *IN VITRO*, *IN VIVO* ED *EX VIVO*

Giorgia Miolo<sup>1</sup>, Federica Gallochio<sup>1</sup>, Sergio Caffieri<sup>1</sup>, Francarosa Baccichetti<sup>1</sup>,  
Cristina Marzano<sup>1</sup>, Maria Gabriella Zanirato<sup>2</sup> e Gerard Beyersbergen van Henegouwen<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Padova;

<sup>2</sup>Dipartimento di Prevenzione-Servizio Veterinario, ASL 17-Veneto, Italia

Il Betametasone è un glucocorticosteroide di sintesi presente in numerose forme farmaceutiche ad uso topico e sistemico per il trattamento di malattie reumatiche e dermatologiche. Il Betametasone è molto instabile alla luce UV (UVB > UVA) ed ha dimostrato effetti collaterali di fotosensibilizzazione in alcuni pazienti che si sono esposti alla luce solare. Poiché il farmaco viene assunto per curare malattie cutanee, non è escluso che le reazioni fototossiche che esso induce siano molto più diffuse e che non siano sempre riconosciute dai pazienti come tali, ma vengano piuttosto scambiate per semplici scottature solari o eczemi.

Sono stati impiegati tre metodi (*in vitro*, *in vivo* ed *ex vivo*) per valutare gli effetti fototossici del Betametasone. La fototossicità *in vitro* è stata determinata irradiando con luce UVB colture di fibroblasti murini Balb/c 3T3 in presenza del farmaco (100 µM). I risultati ottenuti hanno dimostrato che né il Betametasone al buio né la sola irradiazione UVB (0.4 J/cm<sup>2</sup>) riducono la vitalità delle cellule. Al contrario, il Betametasone irradiato con tale dose di luce provoca una moderata riduzione della vitalità delle cellule trattate. La fototossicità *in vivo* è stata valutata attraverso l'induzione di eritema cutaneo sulla cavia. Il farmaco ha provocato eritema cutaneo (200 µg di farmaco + 0.6 J cm<sup>2</sup> UVB) dopo applicazione sia in soluzione metanolica che come crema contenente lo 0,1 % di principio attivo. Come modello di studio *ex vivo* è stata impiegata cute di maiale (epidermide e derma), sulla quale è stata valutata sia la fotodegradazione del farmaco e la formazione di fotoprodotto che la vitalità cellulare dopo il trattamento. Alcuni fotoprodotto stabili assieme a specie radicaliche che si formano come intermedi di reazione durante la scissione di Norrish I e ossigeno singoletto contribuiscono probabilmente agli effetti fotosensibilizzanti indotti dal farmaco.

I tre metodi impiegati hanno fornito risultati comparabili, indicando perciò che i metodi *in vitro* ed *ex vivo* possono essere una valida alternativa a quelli *in vivo* negli studi di fototossicità. Inoltre, date le proprietà fotosensibilizzanti dimostrate dal Betametasone, sembra opportuno consigliare cautela al paziente che lo assume durante l'esposizione alla luce solare o artificiale.

## UTILIZZO DI METALLO-NAFTALOCIANINE COME EFFICACI AGENTI FOTOTERAPEUTICI

**Monica Camerin**<sup>1</sup>, Santiago Rello<sup>2</sup>, Angeles Villanueva<sup>2</sup>, Mike Rodgers<sup>3</sup>, Giulio Jori<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Biologia, Università di Padova, Italia

<sup>2</sup>Dipartimento di Biologia, Università Autonoma di Madrid, Spagna

<sup>3</sup>Bowling Green State University, Bowling Green, Ohio (USA)

Nella terapia fototermica si utilizzano fotosensibilizzatori che in particolari condizioni di irradiazione (laser pulsato operato ad alta frequenza, tale da competere con il tempo di rilassamento termico del sistema) si eccitano e decadono allo stato fondamentale tramite produzione di calore. Il drastico innalzamento di temperatura che si ottiene, dell'ordine dei 100°C, si localizza solo nel microintorno del fotosensibilizzatore. Data l'estesa necrosi e il danno irreversibile indotto su cellule neoplastiche dai sensibilizzatori fototermici si è pensato alla terapia fototermica come ad una nuova modalità di trattamento di tumori superficiali.

Tra i fototermici, oltre a quelli endogeni (melanina, emoglobina) troviamo anche quelli esogeni, come le metallo-naftalocianine. Diverse metallo-naftalocianine sono state studiate per definire l'effetto della natura chimica di ioni metallici coordinati con l'agente fotosensibilizzante sull'efficienza del processo fototermico. Ni-(II)-naftalocianina e Pt-(II)-naftalocianina risultano molto efficienti, tanto da indurre una mortalità, in cellule di melanoma amelanotico B78H1, dopo 20 minuti di irradiazione (pulsanti di 30 ns, 10 Hz, 200 mJ/pulso) pari rispettivamente all'82% e al 69%. La naftalocianina più efficiente si è rivelata la Pd-naftalocianina che induce una mortalità, nelle stesse condizioni di irradiazione, pari all'85%. Il nostro studio si è concentrato sull'influenza esercitata dallo stato di aggregazione e dalla localizzazione subcellulare dei fotosensibilizzatori sull'efficacia del processo di sensibilizzazione fototermica.

Oltre all'applicazione in vitro, l'utilizzo di tali fotosensibilizzatori mostra dati interessanti in studi preliminari su topi C57BL/6 portatori di tumori di melanoma amelanotico: topi trattati con Ni-naftalocianina e irradiati con una potenza di 100 mJ non mostrano ricomparsa tumorale per almeno 20 gg dopo il trattamento.

## **PHOTODYNAMIC DIAGNOSIS AND PHOTODYNAMIC THERAPY FOR BRAIN TUMORS**

**Kostron H, Th. Fiegele, A. Zimmermann**

Dept. Neurosurgery, Medical University Innsbruck, Austria  
Email: herwig.kostron@uibk.ac.at

Objectives/ methods: The median survival of patients suffering from malignant brain tumors is 12 months despite all available therapy. Photodynamic applications, such as Photodynamic Therapy (PDT) and most recently Photodynamic Diagnosis (PDD) are currently undergoing intensive clinical investigations as adjunctive treatment modality for malignant brain tumors. Survival is directly related to the extent of surgical resection. We developed a system for intraoperative tumor detection and fluorescence guided resection which facilitates orientation and allows a more radical tumor removal employing mTHPC. This was followed by intraoperative photodynamic therapy.

Photosensitisation was performed in most of the patients by Fotofrin/ Photosan as well as by second generation sensitizer mTHPC. Intraoperative fluorescence was induced by a UV light source at 370-440 nm. A standard neurosurgical microscope was optimized for fluorescence detection. Intraoperative PDT was carried out by lasers at the appropriate wavelengths and energy.

Results and Conclusion: Variations in the treatment protocols, photosensitizers and light dose make the evaluation statistically difficult, however there is a clear trend towards prolonging median survival after one single photodynamic treatment as compared to standard therapeutic regimens.

PDD proved to be useful in tumor resection accounting for a radical resection in 75% under fluorescence guided resection as compared to 30% in historical group Primary glioblastomas multiforme WHO IV and recurrences demonstrate a median survival of 22 and 9 months as compared to 15 months and 3 months, respectively. Interstitial versus superficial irradiation proved to be equal beneficial.

In addition to our own experience on PDT and PDD mediated by first and second generation photosensitizers we will give an overview of the general results and highlighten the potential future application of photodynamic application in neurosurgery.



## UTILIZZO DI UNA BOROFTALOCIANINA COME AGENTE ANTITUMORALE FOTO- E RADIO-SENSIBILIZZANTE NELLA TERAPIA COMBINATA PDT-BNCT

Elisabetta Friso<sup>1</sup>, Lara Borsetto<sup>1</sup>, Gabrio Roncucci<sup>2</sup>,  
Donata Dei<sup>2</sup>, Paolo Colautti<sup>3</sup> e Giulio Jori<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Biologia, Università di Padova; <sup>2</sup>Molteni Farmaceutici, Firenze;  
<sup>3</sup>Laboratori di Legnaro, Istituto Nazionale di Fisica Nucleare.

PDT e BNCT sono due modalità terapeutiche utilizzate in campo antitumorale. La BNCT utilizza borofenilalanina e borocaptato, che sono caratterizzate da scarsa selettività per il tessuto tumorale. Le ftalocianine, utilizzate in PDT, potrebbero rappresentare, per la buona selettività di accumulo a livello tumorale, buoni veicolanti per atomi di boro ad esse legati ed aprirebbero la possibilità di attuare una terapia antitumorale combinata BNCT+PDT. E' stata sintetizzata una Zn-ftalocianina tetrasostituita contenente 40 atomi di boro (ZnB<sub>4</sub>Pc) che è stata testata *in vitro* su cellule di melanoma melanotico murino (B16F1). La quantità di sostanza accumulata nelle cellule aumenta progressivamente all'aumentare del tempo di incubazione da 5 min a 6 h raggiungendo un plateau corrispondente a 0.6 nmoli di ZnB<sub>4</sub>Pc per g di proteine cellulari. L'efficienza di fotosensibilizzazione su cellule è stata studiata sia in funzione del tempo di irradiazione (1-15 min) che del tempo di incubazione (da 30 min a 24 h). La massima percentuale di mortalità (95 %) si è ottenuta dopo 24 h di incubazione con la ZnB<sub>4</sub>Pc 7 µM e 15 min di irradiazione (600-700 nm, 50 mW/cm<sup>2</sup>). Osservazioni al microscopio a fluorescenza hanno dimostrato colocalizzazione della ZnB<sub>4</sub>Pc con la sonda endosomiale Lucifer Yellow. Studi sul meccanismo di morte cellulare mediante il test della caspasi CPP32 e dell'annexina-V mostrano che il fotoprocesso attivato dalla ftalocianina causa apoptosi solo subito dopo l'irradiazione. Gli esperimenti *in vivo* sono stati eseguiti utilizzando topi C57BL/6 portatori del melanoma melanotico B16F1. Gli studi di farmacocinetica hanno dimostrato che dopo 24 h dall'iniezione i.v. di 3 mg/kg ZnB<sub>4</sub>Pc si ottiene il massimo accumulo (1.5 nmoli di ZnB<sub>4</sub>Pc per g di tumore) e la massima selettività. La PDT è stata eseguita irradiando a 670 nm (250 J/cm<sup>2</sup>) a diversi tempi (3 h, 24 h, 48 h) dopo l'iniezione i.v. di 6 mg/kg di Pc ed è stata osservato un rallentamento sulla crescita tumorale solo dopo 3 h dall'iniezione. Esperimenti di BNCT sono stati eseguiti *in vivo* irradiando con neutroni termici per 20 e 30 min dopo 24 h dall'iniezione di ZnB<sub>4</sub>Pc (6 mg/kg). Si è osservato un ritardo di 4 giorni nella crescita tumorale, ma anche una certa mortalità negli animali irradiati più a lungo e quindi la necessità di migliorare la sorgente di neutroni.

**TERAPIA FOTODINAMICA NELLA TERAPIA DELLE CHERATOSI ATTINICHE  
E DEI CARCINOMI A CELLULE BASALI**

**Luciano Mavilia**, Pietro Cappugi, Riccardo Rossi, Moira Mori,  
Emanuele Francesco Reali, Piero Campolmi, Torello M. Lotti

U. O. Fisioterapia Dermatologica, Dipartimento di Scienze Dermatologiche,  
Università degli Studi di Firenze

La terapia fotodinamica (PDT) è una valida opzione terapeutica nel trattamento delle cheratosi attiniche (AK) e dei carcinomi a cellule basali (BCC) sia utilizzando l'acido 5-aminolevulinico (ALA) che soprattutto il nuovo metil-amino-levulinato (MAL) e luce rossa. Rispetto alle terapie tradizionali (diatermocoagulazione, crioterapia, chirurgia) la PDT è una metodica relativamente semplice da attuare, non necessita di particolari attrezzature, può essere ripetuta più volte nella stessa area cutanea senza anestesia e importanti effetti collaterali e garantendo ottimi risultati clinici ed estetici.

Si discuteranno le nostre esperienze con ALA e più recentemente con MAL mostrando un'ampia e aggiornata iconografia dei nostri risultati clinici e discutendo la possibilità di abbinare un gel a base di diclofenac sodico (Solaraze®) con la PDT nel trattamento delle AK multiple del viso e del cuoio capelluto.

## LOW-COST MICROSCOPY: OVVERO L'ARTE DI ARRANGIARSI

**Franco Fusi**

Dipartimento Fisiopatologia Clinica, Sezione Fisica Medica, Università di Firenze

Uno dei problemi maggiori nella microscopia ottica è lo scarso contrasto che si ottiene nell'osservazione in trasparenza. Per ovviare a questo sono stati perfezionati vari "trucchi" che aumentano il contrasto o colorano il campione. Nel bagaglio del microscopista ci sono ora le tecniche di contrasto di fase, darkfield, DIC, modulazione Hoffman ed altre, ma principalmente le tecniche di fluorescenza.

Nonostante che con le tecniche di fluorescenza, il contrasto migliori notevolmente, si presentano comunque gli effetti di annebbiamento dovuti ai contributi dei piani vicini non a fuoco.

Inoltre le performance dei microscopi ottici sono limitate dall'apertura delle lenti che (per i principi dell'ottica; Abbe 1910) è causa di diffrazione, cosicché la luce proveniente da una sorgente puntiforme viene distribuita su un volume finito. Ciò produce immagini confuse con degrado del rapporto segnale-rumore. Per ovviare a queste limitazioni, in anni recenti sono state sviluppate tecniche per migliorare la progettazione del microscopio.

Di queste sicuramente la più diffusa e commerciale è la microscopia confocale e quella più affascinante e con grandi prospettive è quella a multifotoni. Entrambe hanno però costi molto elevati (la seconda ancor di più) che molti laboratori non possono permettersi.

È comunque possibile revertire matematicamente questo deterioramento dell'immagine.. Questo ultimo approccio è generalmente conosciuto come "deconvoluzione", perché l'effetto di degrado da parte del microscopio può essere descritto matematicamente come la convoluzione del segnale di ingresso con la cosiddetta "Point Spread Function" del sistema ottico. Gli algoritmi di deconvoluzione usano un modello di formazione dell'immagine da parte del microscopio per sottrarre o riassegnare la "confusione" da sfuocatura. Attualmente sono disponibili in commercio un buon numero di algoritmi di deconvoluzione che sono però riconducibili a 2 classi principali.

In questo seminario cercheremo di illustrare le caratteristiche di queste classi e, in generale, di spiegare come le tecniche di deconvoluzione siano utili specialmente per la microscopia di fluorescenza su cellule vive.

**MISURA DEL PROFILO DI INTENSITA' DI UN FASCIO DI ECCITAZIONE UV  
CON L'USO DEL FILM RADIOCROMICO GAFCHROMIC™**

**G. Romano<sup>1</sup>, V. Basile<sup>1</sup>, L. Mercatelli<sup>2</sup>, A. Conti<sup>1</sup>, F. Fusi<sup>1</sup>,**

<sup>1</sup>Dipartimento di Fisiopatologia Clinica, sez. di Fisica Medica, Università di Firenze

<sup>2</sup>Istituto Nazionale di Ottica Applicata (INOA), Largo E. Fermi 2, Firenze

I film radiocromici sono pellicole che se investite da radiazione ionizzante rispondono in modo pressoché immediato con un aumento dell'assorbanza nel rosso. Questo li rende particolarmente utili in radioterapia essendo possibile ottenere, con un singolo irraggiamento, la misura della distribuzione spaziale bidimensionale della dose rilasciata. Grazie ad opportune calibrazioni si può risalire alla misura di dose o di intensità del fascio incidente, attraverso misure di densità ottica nei vari punti della zona irraggiata. La provata sensibilità di queste pellicole anche alla luce ultravioletta (UV) le rende nondimeno interessanti per il monitoraggio dei fasci di eccitazione in esperimenti di microscopia in fluorescenza o autofluorescenza. Nel nostro esperimento abbiamo investito un frammento di pellicola radiocromica con un fascio di luce UV focalizzato sulla stessa da un obiettivo da microscopio. Successivamente si è ottenuta un'immagine della zona annerita, illuminando il film con una sorgente alogena visibile ed acquisendo l'immagine in trasmissione grazie ad una telecamera collegata al microscopio. La risoluzione spaziale intrinseca del film è inferiore al micron, mentre la risoluzione finale è condizionata dal metodo di lettura del film stesso. La sorgente luminosa di eccitazione considerata (lampada a vapori di mercurio) è utilizzata per esperimenti di microscopia di fluorescenza su campioni cellulari e tissutali, per i quali la conoscenza delle dimensioni e della distribuzione spaziale di intensità della luce di eccitazione è fondamentale per una buona riuscita dell'esperimento.

Il film è stato irraggiato con vari tipi di obiettivi e tempi di irraggiamento noti. Successivamente sono state acquisite delle immagini del film in trasmissione, utilizzando l'illuminazione alogena del microscopio, per la quale la sensibilità del film è trascurabile. In regime di risposta lineare, il valore di livello di grigio dei pixel dell'immagine acquisita è proporzionale all'intensità  $I$  del fascio UV di eccitazione. Si è così ottenuto un profilo bidimensionale  $I(x,y)$  in corrispondenza dei vari obiettivi usati, permettendo una conoscenza dettagliata delle dimensioni, della forma e dell'intensità per lo spot di eccitazione, sia per la lampada a mercurio che nel caso di un fascio laser. In particolare si è ricavata una stima dell'uniformità del fascio di eccitazione e dell'energia rilasciata al film per unità di superficie.

**APOPTOSIS INDUCTION IN HL-60 LEUKEMIA CELLS BY  
PHOTOEXCITED TIOPYRANO[2,3-E]INDOL-2-ONES**

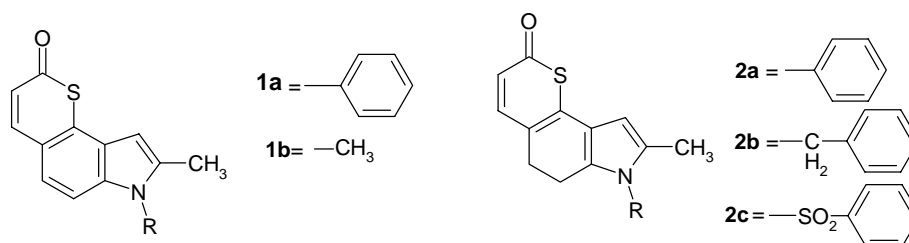
**Alessia Salvador**<sup>1</sup>, Elena Fortunato<sup>2</sup>, Daniela Vedaldi<sup>1</sup>, Francesco Dall'Acqua<sup>1</sup>,  
Paola Barraja<sup>3</sup>, Girolamo Cirrincione<sup>3</sup>, Giampietro Viola<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Farmaceutiche Università degli Studi, Via Marzolo 5, 35131 Padova

<sup>2</sup>Dipartimento di Pediatria Università degli Studi Via Giustiniani 3 35131 Padova

<sup>3</sup>Dipartimento Farmacochimico, Tossicologico e Biologico Università degli Studi,  
Via Archirafi 32, 90123 Palermo

The antiproliferative activity of the title compounds was investigated on different cultured cell lines of human origin, at different concentrations and UVA doses. The tiopyrano[2,3-e]indol-2-ones derivatives **1a-b** and **2a-b** exhibit different values of IC<sub>50</sub>, and a remarkable dose UVA-dependence.



Compound **1b** has shown an excellent antiproliferative activity, although its mechanism of action is not clear, thus a detailed study on a leukemia cell line (HL-60) has been carried out with the purpose to clarify its mechanism of action. Treatment of HL-60 cells with **1b** for 24 h led to profound changes of the cell cycle profile. A characteristic hypodiploid DNA content peak (sub-G1) can be also detected indicating the induction of apoptosis in these cells by the test compound. To further characterize drug-induced apoptosis we performed a biparametric cytofluorimetric analysis using propidium iodide and AnnexinV-FITC which stain DNA and phosphatidylserine residues respectively. The results indicate that compound causes a remarkable induction of apoptosis. Mitochondria play an essential role in the propagation of apoptosis. It is well established that at an early stage apoptotic stimuli alter the mitochondria transmembrane potential ( $\psi_m$ ). We have used flow cytometric analysis with the fluorescent probe JC-1 that is considered a reliable probe to assess  $\psi_m$  changes. The obtained results show that the test compound induces a significant decrease of mitochondrial potential which is well correlated with the extent of phototoxicity. Further experiments carried out with fluorescent probes such as Hydroethidine (HE) and 10N-nonyl acridine orange (NAO) indicate that mitochondrial dysfunction occurs upon treatment of tumor cells by the title compound.

**PHOTOSENSITIZATION OF PATHOGENIC PROTOZOA  
IN TROPHOZOITIC AND CYSTIC STAGES**

**Stefania Ferro**<sup>1,2</sup>, Olympia Coppelotti<sup>1</sup>, Gabrio Roncucci<sup>3</sup>,  
Giulio Jori<sup>1</sup>, Thamer Ben Amor<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Department of Biology, University of Padua

<sup>2</sup> CNR, Institute of Biomedical Technologies, Padova section

<sup>3</sup> Molteni Farmaceutici, Florence

<sup>4</sup> Faculté de Sciences, Université de Gafsa, Tunisia

Many species of protozoa can result pathogenic for humans. The life-cycle of *Acanthamoeba palestinensis* includes an active feeding trophozoitic stage and a dormant cystic stage, which occurs during adverse environmental conditions (food deprivation, desiccation, changes in temperature and pH) and is known to be very resistant to external insults.

In our laboratories this organism, in both stages, was treated using a tetracationic phthalocyanine, RLP068 (Molteni Farmaceutici, Florence). In a typical experiment with trophozoites,  $10^5$  cells/ml in the logarithmic phase of growth were seeded in dishes at 48 h before the incubation with various RLP068 concentrations (0.5-3  $\mu$ M). After 1 h incubation, the dishes were irradiated (600-700 nm; 50 mW/cm<sup>2</sup>) for 10 min.; 24 h after the cells were counted by the eosin exclusion test. The mortality was about 50% and 100% at 0.5  $\mu$ M and 2  $\mu$ M RLP068 concentrations, respectively. In order to study the photosensitivity of the cystic stage, log-phase cells were inoculated in poor Neff medium for 4 days in a rotary shaker at 30°C. On day 4,  $10^5$  cells/ml were incubated with various concentrations of RLP068 for 1 h and then irradiated as described for the trophozoites, but for a longer irradiation time (20 min.). The cysts were centrifuged at 2500 rpm, resuspended in fresh medium and seeded in dishes at 30°C.

After 5 days, corresponding with excystment, the living cells were counted by the eosin exclusion test. Observations at the optical microscope showed a good cyst photoinactivation and considerable damages to the walls at 2  $\mu$ M RLP068; 50% mortality was detectable at 0.5  $\mu$ M phthalocyanine. No effects occurred upon dark incubation. RLP068 was accumulated by the cysts but fluorescence microscopy showed different behaviours towards the photosensitizer, probably due to the cystic population heterogeneity.

Future work will extend our studies to identify the targets of phthalocyanine.

This work was supported in part by NATO grant EST CLG 981136

**DNA BINDING AND DNA PHOTOCLEAVAGING PROPERTIES OF  
PENTA AND HEXACYCLIC DERIVATIVES OF QUINOLIZINIUM ION**

**Anita Faccio**<sup>1</sup>, Francesco Dall'Acqua<sup>1</sup>, Daniela Vedaldi<sup>1</sup>,  
Heiko Ihmels<sup>2</sup>, Anton Granzham<sup>2</sup>, Giampietro Viola<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmaceutical Sciences, University of Padova,  
Via Marzolo 5, I-35131 Padova, Italy

<sup>2</sup>Institute of Organic Chemistry, University of Siegen,  
Adolf-Reichwein-Str. 2, D-57068 Siegen, Germany

Polycyclic aromatic molecules are known to intercalate into double-stranded DNA. The consequences of DNA interactions by exogenous molecules have attracted considerable interest in medicinal chemistry because such a complex formation leads to a significant modification of the DNA structure and may result in a hindered or suppressed function of the nucleic acid in physiological processes. Along these lines, there has been increased interest in the discovery and investigation of compounds that cleave DNA when irradiated with visible or UV light. These compounds, also called photonucleases, exhibit a large potential for therapeutically applications because they are often inert until activated by light and permit to control the reaction both in a spatial and temporal sense. Photonucleases, like any other small DNA-binding molecules, associate by intercalation or by fitting into the minor groove. Importantly, the type and the efficiency of the photocleavage reaction will depend on the binding affinity and the binding site that the photonuclease occupies. Intercalators usually exhibit a planar structure with at least two annulated aromatic rings and, in most cases, a positive charge is required for an appropriate binding affinity. This cationic moiety is usually provided by a quaternary nitrogen atom which may be generated either by simple protonation as for example in the aminoacridine series, or by *N*-alkylation as found in the well-known phenantridine series. Alternatively, the cationic nitrogen atom may be introduced as the bridgehead atom between two annulated aromatic rings such as in the benzo[2*b*]quinolizinium salts, and related quinolizinium salts whose DNA-binding and DNA-photodamaging properties have already been demonstrated. We now conducted a detailed study on the binding interactions of the penta and hexacyclic derivatives of quinolizinium with DNA along with their propensity for photoinduced DNA-damage. We assumed that the extended  $\pi$  system as well as the additional positive charge may lead to more pronounced binding affinity towards DNA compared with tricyclic and tetracyclic derivatives previously studied. Herein, the photobiological features of these new derivatives will be presented and discussed.

**COMBINED EFFECT OF HAEMATOPORPHYRIN AND CaCl<sub>2</sub> ON *ESCHERICHIA COLI*  
IN WASTE WATERS FROM THE AGUILA WATER TREATMENT STATION IN SOUTHERN TUNISIA**

T. Ben Amor<sup>1</sup>, H. Alimi<sup>1</sup>, N. Ben Amor<sup>1</sup>, M. Magaraggia<sup>2</sup> and G. Jori<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculté des Sciences, Université de Gafsa, Tunisia

<sup>2</sup>Department of Biology, University of Padova, Italy

The treatment of waste water in Southern Tunisia, including the area surrounding the town of Gafsa represents a major problem of vital importance owing to the chronic scarcity of rain typical of this region (around 150 mm<sup>3</sup>/year) and the persistently low level of underground reservoirs. Ten interrelated pools have been built in the Aguila site, and the waters collected in these pools are routinely subjected to physical (promoted precipitation of colloidal particles, filtration etc) and chemical (e.g., chlorination) procedures; however, at present, no biological-type treatment for removal or inactivation of pathogenic agents has been activated, mainly because the waters effluent from the station are largely used for irrigation of plants and not for alimentary purposes. In order to expand the potential utilizations of such waters and to prevent the possible onset of epidemic diseases, we undertook some preliminary investigations aimed at defining the feasibility of waste water decontamination by the combined action of porphyrins and visible light. This technique appears to be particularly promising for addressing this kind of problems owing to its low cost, lack of significant impact on environment and the repeatedly ascertained inability of porphyrin-photosensitised processes to promote the selection of resistant microbial strains. As a first step, waste water at the exit of the 10<sup>th</sup> pool, which had been defatted and clarified from mud and slime, was added with haematoporphyrin solutions where the porphyrin concentration ranged from 0 (control sample) to 33 µM, while CaCl<sub>2</sub> amounts between 0 and 2% were also present. The specimens (ca. 10 ml each) were added with *E. coli* (10<sup>6</sup> cells/ml) and either kept in the dark or exposed to various light intensities (20-120 mW/cm<sup>2</sup>) using the white light emitted from an Osram tungsten lamp: The post-treatment growth of *E. coli* cells was measured by counting the colony forming units after treatment of the samples with *E. coli*-specific media. Dark toxicity toward *E. coli* was observed only for haematoporphyrin concentrations of 20 µM or higher. On the other hand, irradiated samples invariably showed a consistent decrease in the bacterial population: e.g. we measured a 29% and 10% residual survival after 10 min. irradiation in the presence of 3.3 and, respectively, 6.7 µM haematoporphyrin. Thus, pilot studies at a field level will now be undertaken.

This investigation was partially supported by NATO grant EST CLG 981136



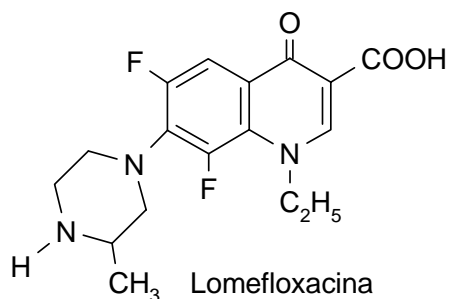
## RISPOSTA CELLULARE AL DANNO FOTOINDOTTO NEL DNA DA LOMEFLOXACINA

Frazia Bettio, Cristina Marzano, Francarosa Baccichetti e Franco Bordin

Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Padova, Via Marzolo 5, Padova, Italia

I fluorochinoloni sono un gruppo di farmaci antinfettivi caratterizzati da una elevata attività antibatterica e da uno spettro molto ampio, assieme ad una modesta incidenza di resistenza. L'efficacia della terapia con fluorochinoloni trae origine dalla loro capacità di inibire selettivamente la girasi batterica, un enzima batterico essenziale. La loro tossicità sistemica è in generale accettabile, ma gran parte dei fluorochinoloni sono instabili se esposti alla luce, dando luogo ad una non trascurabile fototossicità, che si può manifestare con la comparsa di eritemi e di tumori cutanei. Gli studi condotti su sistemi cellulari hanno messo in luce la formazione di mutazioni [1], di micronuclei [2] e di aberrazioni cromosomiche [3].

Attualmente non disponiamo di un quadro completo del danno indotto ai componenti cellulari dalla fotosensibilizzazione con i fluorochinoloni; è stata descritta la formazione di rotture alle catene del DNA [4], la formazione di dimeri della timina [5] e di un danno ossidativo indotto mediante vari meccanismi fotochimici e in particolare di 8-ossiguanina [6].



Per approfondire questi aspetti, abbiamo studiato l'induzione di lesioni nel DNA e alcune risposte in cellule di mammifero fotosensibilizzate da lomefloxacin, scelta come modello. In particolare è stata studiata la formazione di rotture al doppio filamento del DNA, la formazione di legami covalenti tra il DNA e le proteine, l'inibizione della sintesi macromolecolare ed il meccanismo di morte cellulare. Infine, utilizzando un ceppo batterico molto sensibile agli agenti mutageni, l'*Escherichia coli* TM9, abbiamo valutato l'induzione di mutanti.

1. A.A.Chételat, S.Albertini and E.Gocke, *Mutagenesi*, 11, 497-504, 1996
2. S.Itoh, M.Katoh, K.Furuhashi, *Mutat. Res.*, 520, 133-139, 2002
3. S.Itoh, S.Nakayama and H.Shimada, *Mutat. Res.*, 517, 113-124, 2004
4. L.Marrot and C.Agapakis.Causse, *Mutat. Res.*, 468, 1-9, 2000
5. N.J.Traynor and N.K.Gibbs, *Photochem. Photobiol.*, 70, 957-959, 1999
6. S.Sauvaigo, T.Douki, F.Odin, S.Caillat, J.L.Ravanat and J.Cadet, *Photochem. Photobiol.*, 73, 230-237, 2001

## LIPOSOMI CATIONICI PER L'INATTIVAZIONE DI BATTERI GRAM POSITIVI

Stefania Ferro<sup>1,2</sup>, Fernanda Ricchelli<sup>2</sup>, Giovanna Mancini<sup>3</sup>, Giulio Jori<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Biologia dell'Università di Padova

<sup>2</sup>CNR Istituto di Tecnologie Biomediche- Sezione di Padova c/o Dipartimento di Biologia,  
Università degli Studi di Padova

<sup>3</sup>CNR, ICCOM-Sezione di Roma, c/o Dipartimento di Chimica,  
Università degli Studi di Roma "La Sapienza"

L'uso di liposomi cationici DOTAP (N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride) è stato sperimentato in letteratura principalmente per trasfezioni di materiale genico; la carica positiva è sfruttata per l'attrazione elettrostatica sulla doppia elica. Abbiamo incorporato sostanze neutre, ma efficaci nell'inattivazione microbica, come Clorofilla (Chl) ed Ematoporfirina (HP) in questi liposomi, al fine di creare un'attrazione elettrostatica, che potesse favorire l'interazione sostanza-cellula. I liposomi sono stati preparati per iniezione etanolica e sono stati successivamente osservati al microscopio elettronico a trasmissione per definirne forma e dimensioni. Sono stati, quindi, eseguiti esperimenti di fotoinattivazione di cellule batteriche utilizzando questi liposomi. In un tipico esperimento, 2 ml di una soluzione contenente  $2 \cdot 10^8$  batteri per ml sono incubati al buio con 2 ml di sospensione liposomica contenente HP o Chl ad una concentrazione 20  $\mu\text{M}$ . Dopo 2 h d'incubazione la soluzione è stata irradiata con luce bianca ad una velocità di fluenza pari a 100  $\text{mW}/\text{cm}^2$ . Ad intervalli di tempo di 5 minuti sono state prelevate aliquote di campione che venivano diluite e piastrate. Dopo 24 h d'incubazione a 37°C è stata eseguita la conta delle colonie e verificato il calo logaritmico. I risultati ottenuti sono promettenti, anche se, per quanto riguarda la Chl, continua ad essere più efficiente il fotosensibilizzatore in forma libera; per quanto riguarda, invece, l'HP sono stati ottenuti ottimi risultati con la sua incorporazione in DOTAP. Anche a basse concentrazioni, l'HP incorporata in DOTAP risulta più fotoattiva della porfirina libera. Alla concentrazione 10  $\mu\text{M}$  si può, infatti, osservare un calo di circa 6 log già a 10 minuti di irradiazione; mentre ad una concentrazione 5  $\mu\text{M}$  lo stesso calo è osservabile dopo 20 minuti d'irradiazione. I ceppi Gram-negativi, nonostante l'interazione elettrostatica sostanza-cellula, non sono inattivati, probabilmente per il basso tempo di vita dell'ossigeno di singoletto generato nel fotoprocesso, che non riesce a superare lo spessore della doppia parete di questi batteri. Studi futuri permetteranno di caratterizzare meglio l'azione e il tipo di danno indotto alla cellula batterica dalla fotoinattivazione.

**RISPOSTA ALL'IRRAGGIAMENTO UVB NEL CILIATO ANTARTICO *EUPLOTES FOCARDII*  
STUDIATA ATTRAVERSO L'ANALISI DELL'ESPRESSIONE DEI GENI HSP70**

**L. Fulgentini**<sup>1</sup>, V. Passini<sup>2</sup>, R. Marangoni<sup>1</sup>, D. Gioffrè<sup>1</sup>,  
A. La Terza<sup>2</sup>, C. Miceli<sup>2</sup>, G. Colombetti<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto di Biofisica, Sezione di Pisa, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Italia

<sup>2</sup> Dipartimento di Biologia Molecolare, Cellulare e Animale, Università di Camerino,  
Camerino (MC), Italia

La regione Antartica rappresenta uno degli ambienti estremi di maggiore interesse, in particolare per gli ecosistemi acquatici che ospita: gli organismi dei mari antartici si trovano, infatti, a vivere a temperature molto basse e sostanzialmente costanti per tutta la durata dell'anno, in un'acqua estremamente ricca di ossigeno a causa dell'elevata solubilità di questo gas in acqua alle basse temperature. Anche la radiazione solare che raggiunge la Terra in questa regione è peculiare, essendo estremamente variabile in intensità, composizione spettrale e dose totale giornaliera durante l'anno. Le differenze stagionali in composizione spettrale sono essenzialmente dovute all'apertura periodica (durante la primavera) di un "buco dell'ozono" che permette alle radiazioni ad alta energia (UVB) di raggiungere la superficie terrestre.

Dal punto di vista biologico, esiste un crescente interesse nello studio delle strategie adattative adottate dagli organismi Antartici e nella comprensione delle loro basi molecolari. Noi abbiamo focalizzato i nostri studi su *Euplotes focardii* (Valbonesi e Luporini, 1990), un ciliato ipotrico endemico nelle acque costiere dell'Antartide. Il nostro scopo è stato quello di investigare l'attivazione UV-indotta della trascrizione dei geni hsp70, codificanti per una famiglia di proteine heat-shock, e abbiamo quindi cercato di costruire una sorta di spettro di azione "molecolare" della risposta alla radiazione UV irraggiando le cellule per mezzo di un apparato che simula la composizione spettrale e l'intensità della radiazione solare nella primavera antartica, e variando (con combinazioni di filtri neutri e cut-off) in modo sistematico l'esposizione totale alla radiazione UVB. La risposta viene misurata in termini della variazione indotta sui trascritti della famiglia hsp70.

**ROS GENERATION, REDUCTION OF MITOCHONDRIAL TRANSMEMBRANE POTENTIAL AND PROTEIN CARBONYLATION IN APOPTOSIS INDUCED BY SOLAR ULTRAVIOLET RADIATION IN HUMAN HaCaT KERATINOCYTES**

**Alessandra Leonini<sup>1</sup>**, Anna Ettore<sup>1</sup>, Marco Andreassi<sup>2</sup>,  
Leonardo Taurisano<sup>1</sup> and Anna Di Stefano<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Molecular Biology, University of Siena, via Fiorentina 1, 53100 Siena

<sup>2</sup> Department of Pharmaceutical Sciences and Technology,  
University of Siena, via A. Moro, 53100 Siena

Solar ultraviolet radiation (UVR) is the primary cause of skin cancers, acting as both an initiating agent and tumour promoter. Acute irreparable UV-induced DNA damage leads to apoptosis of keratinocytes; failed apoptosis plays an important role in tumour development. The generation of reactive oxygen species (ROS) is thought to play a critical role in the cellular response to UVR. In this study, we investigated UVR-induced oxidative stress in HaCaT keratinocytes from different points of view: the formation of ROS, the changes in mitochondrial transmembrane potential ( $\Delta\psi_m$ ), the levels of total protein carbonylation and the induction of apoptosis. Immortalized keratinocytes (HaCaT), plated at  $1.5 \times 10^4/\text{cm}^2$  in Petri dishes, were exposed to different doses of UV radiation (25-300  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ ) using a Solar UV Simulator (Oriel) with UVB/UVA dichroic mirror and UVC blocking filter. The time course (0-24 h) of ROS generation,  $\Delta\psi_m$  changes and apoptosis were monitored by flow cytometric analysis (1). The amount of carbonyl groups into the proteins was monitored with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNP) and the resulting stable hydrazones were detected spectrophotometrically by anti-DNP-biotin-antibody. All doses of UVR caused an increase of intracellular ROS accumulation starting as early as 0 h after treatment. The loss of  $\Delta\psi_m$  and the appearance of subdiploid DNA content occurred only 12 h after irradiation, as did the increase in protein carbonylation. All these changes were dose and time dependent. By contrast, 24 h after irradiation at 300 mJ, a smaller number of cells (compared to 150 mJ at the same time) showed loss of  $\Delta\psi_m$ , and signs of apoptosis, indicating that a subpopulation of cells did not undergo apoptosis; concomitantly, there was an evident decrease in protein carbonylation. Our results strongly suggest that protein carbonylation is closely associated with UV-induced apoptosis.

1-A Ettore, L Andreassi, C Anselmi, P Neri, L Andreassi, A Di Stefano, *J Invest Dermatol* (2003), 121, 328-336

## INSIDE THE STRUCTURE OF LHCA 3 BY MUTATIONAL ANALYSIS

**Milena Mozzo**<sup>1,2</sup>, Tomas Morosinotto<sup>2,3</sup>, Roberto Bassi<sup>2,3</sup> and Roberta Croce<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto di Biofisica, CNR, Trento, c/o ITC via Sommarie 18, 38100 Povo, Trento, Italy

<sup>2</sup> Dipartimento Scientifico e Tecnologico, Università di Verona,  
Strada Le Grazie, 15-37134 Verona, Italy

<sup>3</sup> Université Aix-Marseille II, LGBP-Faculté des Sciences de Luminy, Département de  
Biologie-Case 901-163, Avenue de Luminy, 13288 Marseille, France

In this work, we analysed with a mutational approach the structure of Lhca3, one component of the antenna system of higher plants Photosystem I. Based on the recent structure of PSI-LHCI (Ben Shem et al., Nature 2003) it has been suggested that Lhca3 has a different folding with respect to all other members of the Lhc family. In particular, it was proposed that the two central helices are swooped and Chls in sites A3 and B3 are not present. This different folding would imply that the Chls coordinated to the two central helices have different ligands in Lhca3 with respect to the other Lhc complexes. This suggestion was tested by mutation analysis, by substituting the putative binding residues with aminoacids not able to coordinate Chls. Data obtained indicate that the mutations in Lhca3 have an effect similar to what observed in the other Lhca complexes. Moreover, also in Lhca3 the red emission forms are originated from interaction between Chls in site A5 and B5, as demonstrated for other PSI antenna subunits. This strongly suggests that Lhca3 folding is very similar to the one of the other antenna proteins. Evidences for the presence of Chls in sites A3 and B3 are also presented.

**DISINFECTION OF WATER FROM TROUT FARMING POOLS AFFECTED BY SAPROLEGNIOSIS  
THROUGH THE COMBINED ACTION OF PORPHYRINS AND VISIBLE LIGHT**

**Michela Magaraggia<sup>1</sup>**, Filippo Faccenda<sup>2</sup>, Leonardo Pontalti<sup>2</sup>,  
Matteo Komjanc<sup>2</sup>, Giulio Jori<sup>1</sup>, Thameur Ben Amor<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, University of Padova

<sup>2</sup>Istituto Agrario S. Michele a/A. Trento

<sup>3</sup>Faculté de Sciences, Université de Gafsa, Tunisia

Saprolegniosis is an ubiquitous fish mycosis. It can frequently develop in fresh water farming and, therefore, it induces considerable damage both to egg production, which reduces hatching, and adult fishes, which causes morbidity and death of infected subjects. One of the main antimycotic agents used is formalin, even if without regulatory authorization, because of its possible carcinogenicity. Therefore, it appears necessary to replace this disinfectant by a new product that combines efficacy and safety for operators and consumers. Porphyrins, both in the dark and activated by visible or sun light, appear to be suitable for replacing formalin, since they represent a valid antimycotic agent, not dangerous for human health and with a low environmental impact. The aim of this work is to apply PDT with porphyrins and their derivatives in a completely new field, such as a modern plant for fish farming. In particular, we classified the pathogen, Saprolegnia, by a morphologic approach, namely optical microscopy, as well as by a molecular approach, that is the genic sequence. At first we performed porphyrin uptake and photosensitization studies on Saprolegnia; on the basis of these results, we applied porphyrin photosensitization studies on trout eggs and adult fishes. The available results show the absence of Saprolegnia species specificity. Moreover, porphyrins are significantly accumulated by fungal cells and induce photosensitivity. The efficacy of porphyrin action on trout eggs is similar to that exhibited by the present disinfectants, while the treatment of adult trouts has a preventive effect toward development of infections, and has an efficient curative action on infected fishes.

This investigation was partially supported by NATO grant EST CLG 981136



# Indice degli autori

Alimi H. ....	31	Gioffrè D. ....	34
Ambrosini S. ....	18	Gobbo S. ....	15
Andreassi M. ....	35	Granzham A. ....	30
Arcangeli C. ....	17	Ihmels H. ....	30
Arosio D. ....	17	Jori G. ....	15, 22, 24, 29, 31, 33, 37
Baccichetti F. ....	21, 32	Komjanc M. ....	37
Bareato U. ....	19	Kostron H. ....	23
Barraja P. ....	28	La Terza A. ....	34
Basile V. ....	18, 27	Lenci F. ....	14
Bassi R. ....	36	Leonini A. ....	35
Beltram F. ....	16, 17	Lotti T.M. ....	25
Ben Amor N. ....	31	Magaraggia M. ....	31, 37
Ben Amor T. ....	29, 31, 37	Mancini G. ....	33
Bettio F. ....	32	Marangoni R. ....	34
Beyersbergen van Henegouwen G. ....	21	Marzano C. ....	21, 32
Bizzarri R. ....	17	Mavilia L. ....	25
Blumthaler M. ....	20	Menabuoni L. ....	18
Bordin F. ....	32	Mercatelli L. ....	27
Borsetto L. ....	24	Miceli C. ....	34
Bottioli G. ....	19	Miolo G. ....	21
Buselli D. ....	14	Monici M. ....	18
Caffieri S. ....	21	Mori M. ....	25
Camerin M. ....	22	Morosinotto T. ....	36
Campolmi P. ....	25	Mozzo M. ....	36
Cappugi P. ....	25	Neri D. ....	19
Cillo U. ....	19	Passini V. ....	34
Cirrincione G. ....	28	Petronilli V. ....	15
Colautti P. ....	24	Pini R. ....	18
Colombetti G. ....	34	Pontalti L. ....	37
Conti A. ....	27	Pratesi R. ....	18
Coppellotti O. ....	29	Reali E.F. ....	25
Croce A.C. ....	19	Rello S. ....	22
Croce R. ....	36	Ricchelli F. ....	15, 33
Dall'Acqua F. ....	28, 30	Rodgers M. ....	22
Dei D. ....	24	Romano G. ....	27
Di Stefano A. ....	35	Roncucci G. ....	24, 29
Diaspro A. ....	13	Rossi F. ....	18
Ettorre A. ....	35	Rossi R. ....	25
Faccenda F. ....	37	Salvador A. ....	28
Faccio A. ....	30	Sgarbossa A. ....	14
Ferro S. ....	29, 33	Taurisano L. ....	35
Fortunato E. ....	28	Vannelli G. ....	18
Freitas I. ....	19	Vedaldi D. ....	28, 30
Friso E. ....	24	Vianello S. ....	15
Fulgentini L. ....	34	Villanueva A. ....	22
Fusi F. ....	26, 27	Viola G. ....	28, 30
Gallocchio F. ....	21	Zanirato M.G. ....	21



