

**ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ**

**Radicali liberi, stress ossidativo e salute**

A cura di Donatella Pietraforte (a) ed Elisabetta Straface (b)

*(a) Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze*

*(b) Dipartimento del Farmaco*

ISSN 1123-3117

**Rapporti ISTISAN**

**05/40**

Istituto Superiore di Sanità

**Radicali liberi, stress ossidativo e salute.**

A cura di Donatella Pietraforte ed Elisabetta Straface  
2005, iii, 126 p. Rapporti ISTISAN 05/40

I dati sperimentali pubblicati in questi anni circa il ruolo dello stress ossidativo nel campo della salute umana suggeriscono che produzione, trasformazione e metabolismo dei radicali siano processi finemente regolati nei tessuti e che un malfunzionamento di questi processi possa portare all'instaurarsi di un danno tissutale di tipo infiammatorio. La cronicizzazione del fenomeno infiammatorio è a sua volta una delle maggiori cause dell' invecchiamento cellulare, dello sviluppo di alcuni tumori, dell'instaurarsi di malattie neurodegenerative e cardiovascolari. I lavori presentati in questa rassegna sono il frutto di due incontri dal titolo "Radicali Liberi, Stress Ossidativo e Salute" che si sono tenuti presso l'Istituto Superiore di Sanità e che hanno visto la partecipazione di ricercatori che, sebbene in differenti campi, si interessano delle conseguenze di questo fenomeno in relazione alla cancerogenesi, alle patologie umane degenerative, ai modelli animali e agli effetti su animali da reddito.

*Parole chiave:* Stress ossidativo, Danno ossidativo, Patologia umana, Radicali liberi, Antiossidanti

Istituto Superiore di Sanità

**Free radicals, oxidative stress and health.**

Edited by Donatella Pietraforte and Elisabetta Straface  
2005, iii, 126 p. Rapporti ISTISAN 05/40 (in Italian)

The recent research on the role of oxidative stress on human health suggests that production, transformation and metabolism of radicals are well regulated processes in tissues and that the deregulation of these processes can lead to the development of inflammatory-like tissue damages. The chronic inflammation is one of the major causes of aging, cancer, cardiovascular and neurodegenerative disease. The contributions presented by researchers with interests focused in this field at two separate meetings titled "Free radicals, oxidative stress and health" recently held at the Istituto Superiore di Sanità. These contributions report studies on the role of oxidative stress related to cancerogenesis, human degenerative diseases, stress animal models, and the importance for the health of the animals for human nourishment.

*Key words:* Oxidative stress, Oxidative damage, Human pathology, Free radicals, Antioxidants

Per informazioni su questo documento rivolgersi a: [pietra@iss.it](mailto:pietra@iss.it).

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: [www.iss.it](http://www.iss.it).

---

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*  
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione: *Paola De Castro, Sara Modigliani e Sandra Salinetti*  
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© Istituto Superiore di Sanità 2005

# INDICE

<b>Presentazione</b> .....	1
<b>Omeostasi del sistema immunitario e stress ossidativo: ruolo delle lipoproteine a bassa densità ossidate</b> .....	3
Introduzione .....	3
Materiali e metodi .....	3
LDL 3 .....	
Induzione della risposta anticorpale antigene-specifica .....	4
Induzione della risposta immunoglobulinica policlonale .....	4
Citofluorimetria a flusso .....	4
Dosaggio delle citochine .....	4
Risultati .....	4
Effetto delle mLDL sulla induzione della risposta anticorpale specifica .....	4
Effetto delle mLDL sull'apoptosi dei linfociti B e sull'espressione sulla loro superficie delle molecole di costimolo .....	5
Effetto delle mLDL sulla produzione di IL-1 $\beta$ .....	6
Effetto dell'aggiunta di IL-1 $\beta$ ricombinante (rIL-1 $\beta$ ) sull'induzione della risposta anticorpale specifica e dell'aggiunta di anti-IL-1 $\beta$ umana sull'attività immunosoppressiva delle mLDL .....	7
Effetto delle mLDL sulla produzione di Ig policlonali e anticorpi anti-mLDL .....	8
Conclusioni .....	8
Bibliografia .....	9
<b>Malattia cardiovascolare e processi ossidativi. Ruolo dell'ossidazione nella trasformazione del macrofago in <i>foam cell</i></b> .....	11
Introduzione .....	11
Lipidi e ossidazione .....	12
Lipoproteine aterogene e formazione delle foam cells .....	12
LDL: ossidazione e aterogenesi .....	13
Antiossidanti e processi di lipoperossidazione .....	13
Bilancio redox intracellulare e formazione delle foam cells .....	14
Chilomicroni remnant (CR), ossidazione e formazione delle foam cells .....	17
Antiossidanti e metabolismo dei CR .....	20
Conclusioni .....	20
Bibliografia .....	21
<b>LDL ossidate e omeostasi del tessuto adiposo: possibili implicazioni patogenetiche</b> .....	27
Introduzione .....	27
Materiali e metodi .....	28
Colture cellulari e differenziamento .....	28
Isolamento delle LDL dal plasma e loro ossidazione .....	28
RT-PCR e Western Blot .....	28
Determinazione della proliferazione cellulare e dell'apoptosi .....	28
Risultati e discussione .....	29
Bibliografia .....	32
<b>Meccanismi di riparazione del danno ossidativo al DNA: modelli <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i></b> .....	33
Meccanismi di riparazione delle basi ossidate del DNA .....	33

Accumulo della base ossidata 8-oxoG in vivo e formazione di tumori .....	34
Ruolo del mismatch repair nella riparazione del danno ossidativo.....	37
Effetto di una iperproduzione di ROS endogeni in un background MMR-difettivo.....	39
Bibliografia.....	42
<b>Riparazione per escissione di basi del danno ossidativo: meccanismi e rilevanza biologica .....</b>	<b>44</b>
Introduzione.....	44
Danno ossidativo e DNA.....	44
Riparazione di 8oxoG/C: ruolo di OGG1 .....	45
Riparazione di 8oxoG/A: ruolo di MYH.....	48
NEIL1 e NEIL2 e riparazione del danno ossidativo nel ciclo cellulare.....	50
Riparazione del danno ossidativo in cellule di mammifero .....	50
Difetti del BER nelle patologie umane .....	52
Bibliografia.....	53
<b>Produzione e riparazione di doppie rotture sul DNA cellulare dopo esposizione a radiazioni ionizzanti.....</b>	<b>57</b>
Introduzione.....	57
Induzione di DSB da parte di radiazioni ionizzanti .....	57
Risposta cellulare al danno radioindotto.....	58
Arresto del ciclo cellulare.....	59
Riparazione delle DSB.....	60
Ruolo dell'istone H2AX nella riparazione delle DSB .....	61
La valutazione delle DSB radioindotte attraverso lo studio delle cinetiche di fosforilazione-defosforilazione dell'istone H2AX.....	62
Ruolo delle fosfatasi nella cinetica di fosforilazione dell'istone H2AX.....	63
Defosforilazione di $\gamma$ -H2AX e ricongiungimento delle DSB .....	64
Confronto tra raggi gamma e ioni carbonio.....	65
Bibliografia.....	65
<b>Effetti fototossici indotti dall'interazione luce-farmaci: meccanismi d'azione a livello cellulare e molecolare .....</b>	<b>68</b>
Introduzione.....	68
I Fluorochinoloni .....	69
Produzione di specie reattive dell'ossigeno.....	72
Meccanismi di fototossicit� .....	73
Conclusioni.....	77
Bibliografia.....	78
<b>Il perossinitrito come induttore di senescenza ed apoptosi nell'eritrocita: ruolo delle aspartil e cisteinil-proteasi .....</b>	<b>80</b>
Introduzione.....	80
Materiali e metodi.....	81
Isolamento degli eritrociti .....	81
Preparazione del perossinitrito .....	81
Trattamenti .....	81
Rilevamento della metaemoglobina (MetHb) .....	81
Elettroforesi e Western blotting.....	82
Shock osmotico indotto da NaCl.....	82
Microscopia elettronica a scansione (SEM) .....	82
Analisi morfometrica.....	82
Valutazioni del contenuto di glutatione (GSH) .....	82
Analisi citometrica .....	83

Determinazione della fosfatidilserina .....	83
Quantità intracellulare dei tioli ridotti .....	83
Attività delle caspasi .....	83
Attività della catepsina e della calpaina .....	84
Analisi statistica .....	84
<b>Risultati</b> .....	84
Effetti ossidativi del perossinitrito .....	84
Effetti del perossinitrito sulla struttura del globulo rosso .....	84
Effetto del perossinitrito sui gruppi tiolici .....	85
Effetti del perossinitrito sulle molecole di superficie .....	86
Effetto del perossinitrito sull'attività della Catepsina E e della $\mu$ -Calpaina .....	88
Effetto del perossinitrito sulla esposizione della fosfatidilserina (PS) .....	89
Effetto del perossinitrito sull'attività delle proteasi .....	90
<b>Discussione</b> .....	92
Squilibrio ossidativo e senescenza .....	93
Meccanismi di morte cellulare .....	93
Bibliografia .....	95
<b>Valutazione dello stress ossidativo negli animali da reddito</b> .....	100
Introduzione .....	100
Stress ossidativo e genetica negli animali da reddito .....	100
Applicazioni di interesse veterinario .....	101
Valutazione dello stress da trasporto .....	101
Valutazione di trattamenti farmacologici in atto .....	102
Qualità dell'ambiente in cui vivono gli animali .....	103
Alimentazione animale .....	103
Benessere alla macellazione .....	103
Profili di PAO e di ROMs in animali da reddito .....	104
Conclusioni .....	105
Bibliografia .....	105
<b>Antiossidanti polifenolici della dieta nella prevenzione delle patologie degenerative</b> .....	107
Introduzione .....	107
Ipotesi antiossidante .....	107
Fattori che contribuiscono alla differente attività biologica dei polifenoli <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	109
Diverso assorbimento a livello gastrico (biodisponibilità) .....	110
Biotrasformazione a livello gastrico .....	111
Attività tipo xenobiotici .....	112
Coopertività e sinergismo tra antiossidanti assunti con la dieta e antiossidanti endogeni .....	112
Ipotesi dei polifenoli come molecole segnale .....	112
Attività antiossidante dei polifenoli nel tratto gastrointestinale .....	114
Conclusioni .....	115
Bibliografia .....	115
<b>Un modello sperimentale di ipofunzionalità colinergica durante lo sviluppo: effetti comportamentali e neurochimici</b> .....	121
Introduzione .....	121
Effetti a breve termine dell'ipofunzionalità colinergica neonatale .....	122
Effetti a lungo termine .....	123
Valutazioni elettrofisiologiche e neurochimiche .....	124
Bibliografia .....	125



## PRESENTAZIONE

Maurizio Minetti (a) Orazio Saporà (b), Walter Malorni (c)

(a) *Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze*

(b) *Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria*

(c) *Dipartimento del Farmaco*

Parole come “radicali liberi” e “antiossidanti” sono entrati recentemente nell’immaginario collettivo grazie in gran parte all’azione massiccia dei mezzi d’informazione. Si può dire che non esista rivista, giornale o trasmissione televisiva sulla salute che non abbia trattato direttamente il tema dei radicali liberi e/o degli antiossidanti. Quest’azione divulgativa ha comportato tuttavia una eccessiva semplificazione del problema che oggi viene percepito genericamente come una lotta tra sostanze benefiche (antiossidanti) e sostanze dannose (radicali liberi); lotta che nel caso di prevalenza dei radicali vede una accelerazione dell’invecchiamento dei tessuti, e l’instaurarsi di gravi patologie quali le malattie cardiovascolari e neurodegenerative, il diabete, il cancro. In realtà le cose sono molto più complesse e i radicali nei tessuti svolgono la funzione di molecole segnale oltre ad essere intermedi di reazioni enzimatiche e chimiche. I radicali sono, quindi, necessari al corretto funzionamento delle cellule e, anche facendo uso massiccio di sostanze riducenti o “antiossidanti”, sarebbe insensato oltre che impossibile eliminarli. Quando nel tessuto o nella cellula la regolazione dell’omeostasi dei radicali non funziona correttamente si può instaurare una situazione di stress dovuta ad una aumentata presenza di radicali ossidanti. In questi casi viene spesso utilizzato il termine “stress ossidativo” ad indicare uno sbilanciamento verso una maggiore ossidazione del tessuto, misurabile dalla comparsa di specie ossidate presenti nei maggiori costituenti della cellula quali lipidi, proteine, DNA, carboidrati e/o dalla riduzione dei livelli di riducenti naturali.

Noi viviamo un autentico paradosso biologico. Infatti la molecola dell’ossigeno, essenziale e alla base della vita su questo pianeta, è anche reattiva e tossica, questo sottopone ad un continuo stress ossidativo il nostro materiale genetico. Se non fosse per la presenza all’interno delle nostre cellule di sistemi che controllano l’integrità dell’informazione e riparano continuamente i difetti presenti, in breve tempo la vita sparirebbe dalla superficie terrestre.

D’altra parte lo stress ossidativo non deve essere considerato solo come un evento negativo ma svolge anche funzioni fisiologiche: ad esempio una situazione transiente di stress ossidativo costituisce uno dei meccanismi fondamentali di funzionamento per (a) rispondere a/o inviare molti tipi di segnale (ormoni, neurotrasmettitori, citochine ecc.), (b) difendersi dagli agenti infettivi e (c) variare lo stato redox necessario ad avviare un processo differenziativo.

La cronicizzazione dello stress ossidativo, al contrario, costituisce una condizione di rischio per processi degenerativi e può portare all’instaurarsi di una situazione patologica. È ad esempio ben noto che numerose patologie sia su base genetica che acquisite sono associate ad alterazioni dello stato redox della cellula. Queste possono avere un ruolo patogenetico o, al contrario, esserne un prodotto. Nel primo caso la produzione di specie pro-ossidanti (o la diminuzione delle “difese” antiossidanti) altera la normale fisiologia cellulare e può portare ad alterazioni dei processi vitali della cellula e di conseguenza ad alterazioni dell’omeostasi dei tessuti. Modificazioni della “corretta” proliferazione e/o della morte cellulare così come cambiamenti della funzionalità cellulare (contrattilità, funzione mitocondriale, ecc.) sono infatti determinanti nell’insorgenza di patologie degenerative, nei tumori o nei processi associati all’invecchiamento. Nel secondo caso, una alterazione del bilancio redox è secondaria a processi patologici (alcune infezioni virali o in trattamenti farmacologici in campo oncologico, ad

esempio) e, in questi casi, le alterazioni redox possono diventare un importante e utile “bioindicatore” di progressione di malattia. Per converso, un trattamento con antiossidanti può rappresentare una opzione importante non tanto a fini strettamente terapeutici sulla patologia “principale” ma piuttosto ai fini di un miglioramento delle condizioni di vita dei pazienti, della qualità della loro vita. La comprensione del complesso ruolo del bilancio redox sia a livello subcellulare che a livello “sistemico” può quindi rappresentare un utile strumento in termini patogenetici, diagnostici, prognostici e terapeutici.

Nel nostro Istituto questi argomenti vengono affrontati in modo multidisciplinare e sotto molteplici punti di vista che vanno dalle patologie degenerative, all’invecchiamento, ai farmaci, agli alimenti, al comportamento animale, coinvolgendo gruppi presenti nei Dipartimenti Farmaco, Ematologia Oncologia e Medicina Molecolare, Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Tecnologia e Salute, Biologia Cellulare e Neuroscienze, e nel Centro per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari. La complessità dell’argomento da un lato, e la diversità dei diversi approcci sperimentali dall’altro, ha fatto nascere la necessità di creare un coordinamento e un dibattito più approfondito all’interno dell’Istituto. I dati del presente Rapporto riuniscono i contributi presentati da molti dei gruppi che hanno partecipato a due tavole Rotonde tenute in Istituto su questo argomento.

# OMEOSTASI DEL SISTEMA IMMUNITARIO E STRESS OSSIDATIVO: RUOLO DELLE LIPOPROTEINE A BASSA DENSITÀ OSSIDATE

Luciana Giordani (a), Benedetta Mattioli (a), Maria Giovanna Quaranta (a), Elena Giacomini (b), Irene Libri (a), Rosaria Vari (c), Roberta Masella (c), Marina Viora (a)

(a) Dipartimento del Farmaco

(b) Dipartimento Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate

(c) Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e Rischi Alimentari

## Introduzione

Le lipoproteine a bassa densità ossidate (LDL *Low Density Lipoprotein*) hanno un ruolo importante nella patogenesi dell'aterosclerosi ed esercitano effetti pleiotropici su varie funzioni cellulari (1-4). Le LDL, per il loro contenuto in acidi grassi poliinsaturi, sono particolarmente suscettibili all'attacco di radicali liberi e, pertanto alla lipoperossidazione. Le modificazioni ossidative delle LDL ne alterano le proprietà biologiche aumentandone il potere aterogeno e la tossicità. Le cellule del sistema immunitario sono importanti target dell'azione delle LDL ossidate (oxLDL) grazie alla presenza di recettori specifici sulla loro superficie. Le oxLDL sono potenti modulatori dell'infiammazione e sono in grado di innescare risposte immuni sia innate che adattative. Immunoglobuline (Ig) circolanti anti-oxLDL sia di classe IgG che IgM sono presenti nel plasma umano e formano immunocomplessi con le oxLDL a livello delle lesioni aterosclerotiche (5-6). L'ossidazione delle LDL può essere ottenuta *in vitro* utilizzando vari sistemi ed è stato osservato che le LDL ossidate *in vitro* hanno caratteristiche biochimiche e immunologiche simili alle oxLDL estratte dalle lesioni aterosclerotiche (7). Molti studi hanno dimostrato che le oxLDL modulano le funzioni di molte cellule del sistema immunitario quali linfociti T, cellule natural killer, monociti e cellule dendritiche (4, 8-12). I linfociti B svolgono un ruolo critico nelle risposte immuni adattative ed è stato dimostrato che sono presenti a livello della lesione aterosclerotica.

## Materiali e metodi

### LDL

Le LDL sono state isolate con ultracentrifugazione da un pool di plasma fresco di donatori sani. Per ottenere LDL moderatamente ossidate (mLDL) un'aliquota della preparazione di LDL (1,2 mg/ml) è stata ossidata all'aria a temperatura ambiente per 18 ore. L'ossidazione in coltura è stata bloccata aggiungendo EDTA. Il grado di ossidazione delle mLDL è stato valutato tramite la determinazione degli idroperossidi, delle sostanze reattive all'acido tiobarbiturico (TBAR) e della mobilità elettroforetica relativa (REM). Come controllo sono state utilizzate preparazioni di LDL native (nLDL) in cui il processo di autoossidazione è stato bloccato aggiungendo EDTA o vitamina E.

## **Induzione della risposta anticorpale antigene-specifica**

L'antigene corpuscolato *Candida albicans* (ceppo BP, sierotipo A) e la mannosio-proteina, purificata dalla parete cellulare di *C. albicans*, sono state preparate come precedentemente descritto (13). La risposta anticorpale all'antigene *C. albicans*, è stata ottenuta *in vitro* secondo il protocollo precedentemente descritto (14). L'antigene viene aggiunto alle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) ottenute da soggetti sani, ad una concentrazione di  $1.7 \times 10^6$ /ml. Dopo 9 giorni, le colture vengono raccolte e le cellule secernenti anticorpo (ASC) specifico verso la mannosio-proteina della parete cellulare di *C. albicans* sono state enumerate mediante ELISPOT (15).

## **Induzione della risposta immunoglobulinica policlonale**

Per l'induzione di immunoglobuline i PBMC sono stati stimolati con il mitogeno Pokeweed (PWM) ad una concentrazione finale di 1.25 µg/ml. Dopo 8 giorni di coltura le cellule secernenti immunoglobuline IgG ed IgM (IgG, IgM-SC) sono state enumerate mediante ELISPOT (15).

## **Citofluorimetria a flusso**

L'analisi della espressione delle molecole di costimolo CD40/CD27 e dell'apoptosi dei linfociti B è stata effettuata mediante citofluorimetria, utilizzando anticorpi monoclonali coniugati con fluorocromi. Le cellule sono state raccolte dopo 24, 48 e 72 ore di trattamento con mLDL, lavate con PBS 1% e colorate mediante incubazione con gli anticorpi monoclonali per 30 minuti a 4 °C.

## **Dosaggio delle citochine**

È stato valutato l'effetto delle mLDL sulla produzione delle varie citochine sia a livello di proteina, tramite le tecniche ELISPOT ed ELISA, sia a livello di trascrizione di mRNA tramite la tecnica RT-PCR semiquantitativa. Mediante ELISA è stata valutata la concentrazione delle varie citochine nei supernatanti delle colture non trattate o trattate con mLDL a vari tempi mentre mediante ELISPOT sono state enumerate le cellule secernenti le citochine nelle stesse colture. Per la determinazione dei livelli di mRNA l'RNA cellulare totale è stato estratto utilizzando kits commerciali. L'mRNA è stato retrotrascritto in cDNA e amplificato per i geni delle citochine di interesse mediante il kit Access RT-PCR System. I livelli di mRNA sono stati normalizzati ai livelli di mRNA del GAPDH.

# **Risultati**

## **Effetto delle mLDL sulla induzione della risposta anticorpale specifica**

L'attività immunomodulante delle mLDL è stata valutata sull'induzione della risposta anticorpale verso l'antigene T-dipendente *C. albicans* in colture di PBMC umani normali. Come mostrato in Fig.1a, le mLDL inducevano una diminuzione significativa del numero di cellule secernenti anticorpi specifici (ASC) anti-*C. albicans* di classe IgG (\*p<0,01). Tale inibizione non

è dovuta ad un effetto tossico in quanto il test di vitalità cellulare con il Tripan bleu, effettuato contemporaneamente alla raccolta delle cellule, mostrava che il numero di cellule vitali nelle colture trattate con mLDL era simile al numero di cellule vitali nelle colture di controllo non trattate (dati non mostrati). In tutti gli esperimenti effettuati sono state aggiunte le nLDL come controllo ed è stato osservato che esse non inducevano alcuna modulazione della risposta anticorpale specifica nelle condizioni sperimentali descritte. Allo scopo di determinare se l'inibizione dell'induzione di ASC specifiche fosse mediata dal legame specifico delle mLDL ai propri recettori, sono stati bloccati i principali recettori che legano e internalizzano le mLDL. A tal fine è stato utilizzato il fucoidan, un ligando polianionico che lega i recettori *scavenger* di classe A (16), o un anticorpo monoclonale anti-CD36 che riconosce in modo specifico il recettore *scavenger* di classe B (17). L'effetto inibitorio indotto dalle mLDL veniva completamente abrogato sia dalla preincubazione con il fucoidan sia dall'anticorpo anti-CD36 (Fig 1b) (\*p<0,05).

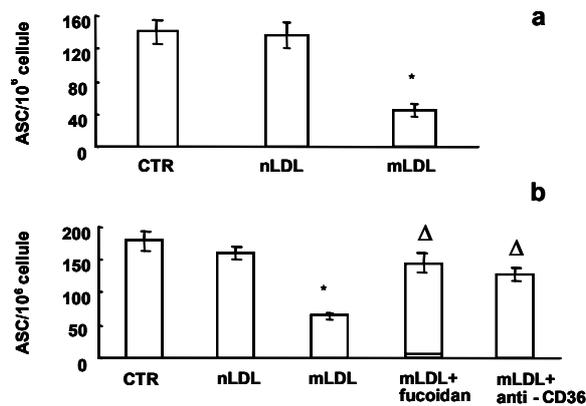


Figura 1. Effetto delle mLDL sulla induzione della risposta anticorpale specifica

### Effetto delle mLDL sull'apoptosi dei linfociti B e sull'espressione sulla loro superficie delle molecole di costimolo

Per valutare se l'inibizione della produzione di anticorpi specifici indotta dalle mLDL fosse dovuta ad un loro effetto citopatico sui linfociti B, è stata analizzata l'induzione di apoptosi nelle colture di PBMC trattati e non con mLDL. È stato osservato che dopo 18 ore di coltura né le mLDL né le nLDL inducevano l'apoptosi come dimostrato dalla percentuale di cellule Annessina V<sup>+</sup>/CD20<sup>+</sup> (Tabella 1). Come controllo positivo dell'apoptosi è stato utilizzato il 2-deossi-D-ribosio.

Tabella 1. Effetto delle mLDL sull'induzione di apoptosi delle cellule B nelle colture stimolate da *C. albicans*

Coltura	% Annessina V <sup>+</sup> /CD20 <sup>+</sup> *
CTR	3±0.2
2-deossi-D-ribosio	30±0.5**
nLDL	4±0.3
mLDL	5±0.5

\* Media± Errore Standard della Media (SEM) di tre esperimenti diversi

\*\*p<0,05

Poiché l'attivazione dei linfociti B richiede segnali di costimolo forniti dal contatto specifico con i linfociti T *helper*, abbiamo analizzato gli effetti delle mLDL sull'espressione delle molecole di costimolo sulla superficie delle cellule B nelle colture stimulate con la *C. albicans*. Come mostrato nella tabella 2 dopo 18 ore di coltura le mLDL non inducevano alcuna modulazione dell'espressione delle molecole di costimolo CD40 e CD27. Risultati simili sono stati ottenuti dopo 48 e 72 ore di coltura (dati non mostrati).

**Tabella 2. Effetto delle mLDL sulla espressione delle molecole di costimolo sulla superficie dei linfociti B**

Coltura	CD20 <sup>+</sup> /CD40 <sup>+</sup>		CD20 <sup>+</sup> /CD27 <sup>+</sup>	
	% di cellule positive**	MFI***	% di cellule positive**	MFI ***
CTR	98±2	38±2	52±2	40±3
nLDL*	99±1	40±3	49±3	42±1
mLDL*	97±3	37±2	50±2	43±2

\* Alle colture stimulate da *C. albicans* sono state aggiunte nLDL o mLDL. Dopo 18 ore di coltura le cellule sono state raccolte e colorate con CD40-FITC e CD20-PE o con CD27-FITC e CD20-PE

\*\* Media ± SEM di tre esperimenti diversi

\*\*\* Media dell'intensità di fluorescenza (MFI) ± SEM di tre esperimenti diversi

### Effetto delle mLDL sulla produzione di IL-1 $\beta$

Poiché le risposte dei linfociti B ad antigeni T-dipendenti richiedono sia il contatto specifico cellula-cellula sia la produzione di citochine che guidano le diverse fasi della differenziazione delle cellule B, abbiamo valutato l'effetto delle mLDL sulla produzione di alcune citochine sia a livello di proteina che di sintesi di mRNA. A tale scopo i PBMC sono stati stimolati con l'antigene *C. albicans* e trattati e non con le mLDL. Dopo 72 ore di coltura le cellule sono state raccolte e saggiate per la produzione di citochine mediante ELISPOT. Come mostrato in Figura 2a le mLDL inducono un aumento significativo del numero di cellule secernenti IL-1 $\beta$  (\* $p$ <0,05 vs CTR e vs nLDL). Le nLDL non aumentano il numero di cellule secernenti IL-1 $\beta$ . Al contrario, le mLDL non modulano il numero di cellule secernenti IL-6, IL-4, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (dati non mostrati).

La produzione di citochine è stata dosata anche nei soprannatanti dopo 9 giorni di coltura mediante ELISA. Come mostrato nella Figura 2b le mLDL inducono un significativo aumento del rilascio di IL-1 $\beta$  (\* $p$ <0,05 vs CTR e vs nLDL) mentre le nLDL non mostrano alcun effetto. L'accumulo di IL-6, IL-4, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  nei soprannatanti delle stesse colture non viene modulata dalle mLDL (dati non mostrati).

Infine, sono stati analizzati i livelli di mRNA per le citochine mediante RT-PCR semiquantitativa. Come mostrato in Figura 2c dopo 24 e 48 ore di coltura le mLDL inducono un significativo aumento dei livelli di mRNA per IL- $\beta$  mentre la nLDL non inducono alcun effetto.

Diversamente, i livelli di mRNA per IL-6, IL-4, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  non vengono modulati dalle mLDL (dati non mostrati).

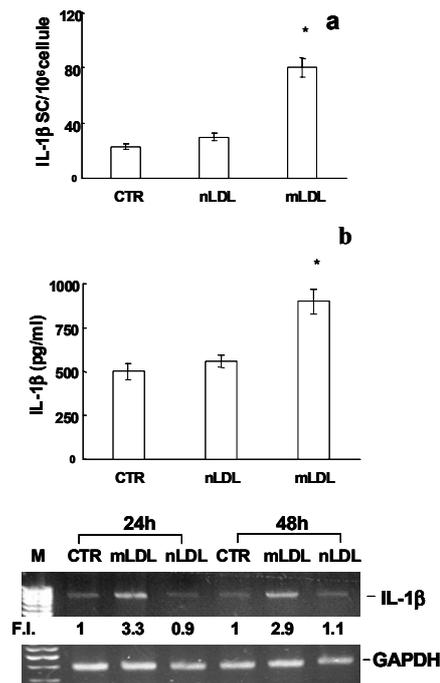
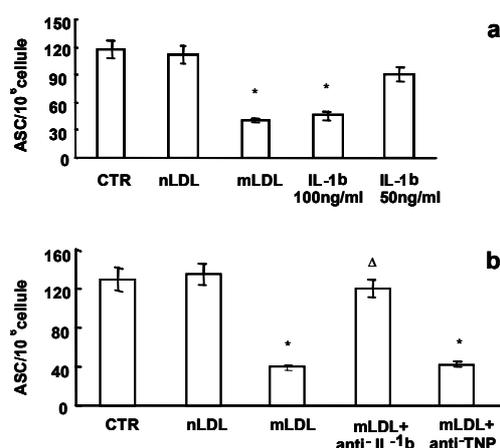


Figura 2. Effetto delle mLDL sulla produzione di IL-1 $\beta$

### Effetto dell'aggiunta di IL-1 $\beta$ ricombinante (rIL-1 $\beta$ ) sull'induzione della risposta anticorpale specifica e dell'aggiunta di anti-IL-1 $\beta$ umana sull'attività immunosoppressiva delle mLDL

Poiché le mLDL inibiscono le risposte anticorpali specifiche anti-*C. albicans* e nelle stesse colture è stato riscontrato un aumento della produzione di IL-1 $\beta$ , è stato valutato l'effetto della rIL-1 $\beta$  sull'induzione della risposta anticorpale specifica da parte di PBMC stimolati con la *C. albicans*. Per questo scopo, alle colture sono state aggiunte quantità crescenti di rIL-1 $\beta$  umana. I risultati in Figura 3a mostrano che 100 ng/ml di IL-1 $\beta$  inibiscono significativamente (\* $p < 0,01$  vs CTR e vs nLDL) la risposta anticorpale alla *C. albicans*, suggerendo che l'effetto inibitorio delle mLDL potrebbe essere mediato da un aumento della produzione di IL-1 $\beta$ . L'aggiunta di 50 ng/ml di rIL-1 $\beta$  induce una leggera inibizione della risposta anticorpale specifica. Per verificare se l'aumento di IL-1 $\beta$  osservato fosse effettivamente responsabile dell'effetto inibitorio sull'induzione della risposta anticorpale specifica, alle colture trattate con le mLDL è stato aggiunto un anticorpo neutralizzante policlonale murino anti-IL-1 $\beta$  umana. È stato osservato che l'anti-IL-1 $\beta$  umana determina un completo recupero della capacità delle cellule di rispondere all'antigene in presenza delle mLDL (Figura 3b) (\* $p < 0,01$  vs CTR e vs nLDL;  $\Delta p < 0,05$  vs mLDL), mentre l'aggiunta in coltura dell'anticorpo di controllo anti-2,4,6-trinitrofenile non induce alcun effetto. Questo risultato fornisce un ulteriore supporto all'ipotesi che l'attività immunosoppressiva delle mLDL sull'induzione delle risposte anticorpali specifiche anti-*C. albicans* possa essere mediato da un aumento precoce della produzione di IL-1 $\beta$ .



**Figura 3. Effetto dell'aggiunta di IL-1β ricombinante (rIL-1β) sull'induzione della risposta anticorpale specifica e dell'aggiunta di anti-IL-1β umana sull'attività immunosoppressiva delle mLDL**

### Effetto delle mLDL sulla produzione di Ig policlonali e anticorpi anti-mLDL

Per definire ulteriormente l'attività immunomodulante delle mLDL sulle funzioni dei linfociti B, è stato analizzato il loro effetto sull'induzione della produzione di immunoglobuline policlonali in colture di PBMC stimolati con PWM. I risultati mostrati nella Tabella 3 indicano che le mLDL aggiunte all'inizio della coltura inducono un aumento significativo del numero delle cellule secernenti immunoglobuline (ISC) di classe IgM ed IgG. Le nLDL aggiunte alle stesse colture inducevano un modesto aumento del numero delle ISC.

È stata quindi determinata la specificità delle immunoglobuline prodotte in seguito all'aggiunta delle mLDL. Come riportato nella Tabella 3 le colture trattate con mLDL mostrano un aumento della produzione di anticorpi specifici per le mLDL. Nelle stesse condizioni sperimentali le nLDL non inducono la produzione di immunoglobuline anti-mLDL.

**Tabella 3. Effetto delle mLDL sulla produzione di Ig policlonali e di anticorpi IgM anti-mLDL**

Coltura	IgM-SC/10 <sup>6</sup>	IgG-SC/10 <sup>6</sup>	Anti-mLDL IgM-ASC/10 <sup>6</sup>	Anti-nLDL IgM-ASC/10 <sup>6</sup>
CTR	1200±10	1800±17	0	0
nLDL	1600±15	2200±21	100±1	0
mLDL	11200±11*	14000±13*	1500±13*	0

\* p<0,01 vs CTR and vs nLDL

## Conclusioni

I risultati ottenuti in questo studio dimostrano che le mLDL inibiscono significativamente l'induzione della risposta anticorpale specifica verso l'antigene T-dipendente *C. albicans* da parte di PBMC umani normali. Tale inibizione è mediata dall'aumento precoce della produzione

di IL-1 $\beta$ . Inoltre, le mLDL aumentano la produzione di Ig policlonali in colture stimulate da PWM e, più rilevante, le mLDL inducono nelle stesse colture la produzione di IgM anti-mLDL.

In questo studio è stato utilizzato un sistema *in vitro* in cui i PBMC umani normali sono indotti a montare una risposta anticorpale specifica verso l'antigene T-dipendente *C. albicans* in presenza di mLDL come un modello di risposta dei linfociti B nell'aterosclerosi.

Questi risultati potrebbero fornire nuove acquisizioni circa il ruolo chiave esercitato dalle LDL quali modulatori delle funzioni dei linfociti B contribuendo così, alla comprensione del meccanismo attraverso il quale uno specifico componente del sistema immune, interferisce con la patogenesi dell'aterosclerosi. Inoltre, questi risultati potrebbero rappresentare un utile modello per identificare nuovi approcci terapeutici che coinvolgono l'immunomodulazione.

## Ringraziamenti

Questo lavoro è stato supportato da un finanziamento (N.C3MV, Responsabile Scientifico M. Viora) del Ministero della Sanità.

## Bibliografia

1. Rajavashisth T, Yamada H, Mishra NK Transcriptional activation of the macrophage-colony stimulating factor gene by minimally modified LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1591-98.
2. McMurray HF, Parthasarathy S, Steinberg D. Oxidatively modified low density lipoprotein is a chemoattractant for human T lymphocytes. *J Clin Invest* 1993;92:1004-08.
3. Augé N, Pieraggi MT, Thiers JC, Nègre-Salvayre A, Salvayre R. Proliferative and cytotoxic effects of mildly oxidized low-density lipoproteins on vascular smooth-muscle cells. *Biochem J* 1995;309:1015-20.
4. Viora M, Straface E, Di Genova G, Fattorossi A, Rivabene R, Camponeschi B, Masella R, Malorni W. Oxidized low density lipoproteins impair peripheral blood mononuclear cell proliferation and cytokine production. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;232:359-63.
5. Shaw PX, Horkkő S, Chang MK, Curtiss LK, Palinski W, Silverman GJ, Witztum JL Natural antibodies with the T15 idiotype may act in atherosclerosis, apoptotic clearance, and protective immunity. *J Clin Invest* 2000;105:1731-40.
6. Ylä-Herttuala S, Palinski W, Butler SW, Picard S, Steinberg D, Witztum JL. Rabbit and human atherosclerotic lesions contain IgG that recognizes epitopes of oxidized LDL. *Arterioscler Thromb* 1994;14:32-34.
7. Ylä-Herttuala S, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, Carew TE, Butler S, Witztum JL, Steinberg D. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest* 1989, 84:1086-95.
8. Malorni W, Straface E, Di Genova G, Fattorossi A, Rivabene R, Camponeschi B, Masella R, Viora M. Oxidized low-density lipoproteins affect natural killer cell activity by impairing cytoskeleton function and altering the cytokine network. *Exp Cell Res* 1997, 236:436-45.
9. Viora M, Quaranta MG, Straface E, Vari R, Masella R, Malorni W. Redox imbalance and immune functions: opposite effects of oxidized low-density lipoproteins and N-acetylcysteine. *J Immunol* 2001, 104:431-38.
10. Alcouffe J, Therville N, Ségui B, Nazzal D, Blaes N, Salvayre R, Thomsen M, Benoist H. Expression of membrane-bound and soluble FasL in Fas-and FADD-dependent T lymphocyte apoptosis induced by mildly oxidized LDL. *FASEB J* 2004;18:122-24.

11. Fortun A, Khalil A, Gagne D, Douziech N, Kuntz C, Jay-Gerin JP, Dupuis G, Fulop T Jr. Monocytes influence the fate of T cells challenged with oxidised low density lipoproteins towards apoptosis or MHC-restricted proliferation. *Atherosclerosis* 2001, 156:11-21.
12. Perrin-Cocon L, Coutant F, Agaogue S, Deforges S, Andre P, Lotteau V. Oxidized low-density lipoprotein promotes mature dendritic cell transition from differentiating monocyte. *J Immunol* 2001, 167:3785-91.
13. Torosantucci A, Palma C, Boccanera M, Ausiello CM, Spagnoli GC, Cassone A. Lymphoproliferative and cytotoxic responses in cultures of human peripheral blood mononuclear cells to mannoprotein constituents of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* 1990;136:2155-63.
14. Giacomini E, Boccanera M, Giordani L, Cassone A, Luzzati A. L. Induction of antibody forming cells with specificity for *Candida albicans* mannoproteins in cultures of human peripheral blood lymphocytes. *J Immunol Meth* 1993;164:203-11.
15. Sedgwick JD, Holt PG. ELISA-plaque assay for the detection of single antibody-secreting cells. In: Kemeny DM, Challacombe SJ (Ed) *ELISA and other solid phase immunoassays*. Chichester Wiley;1988. p 241-63.
16. Dhaliwal BS, Steinbrecher UP Scavenger receptors and oxidized low density lipoproteins. *Clin Chim Acta* 1999;286:191-05.
17. Krieger M, Herz J. Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu Rev Biochem* 1994;63:601-37.

# MALATTIA CARDIOVASCOLARE E PROCESSI OSSIDATIVI. RUOLO DELL'OSSIDAZIONE NELLA TRASFORMAZIONE DEL MACROFAGO IN *FOAM CELL*

Elena Bravo, Mariarosaria Napolitano  
Dipartimento di Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare

## Introduzione

Il macrofago gioca un ruolo fondamentale nello sviluppo della lesione aterosclerotica in quanto media i processi infiammatori nell'intima e rappresenta il sito primario di accumulo lipidico (1, 2). Un evento precoce nello sviluppo della lesione aterosclerotica è infatti rappresentato dalla formazione delle *foam cells*. I monociti circolanti in seguito all'adesione con le cellule endoteliali, penetrano, attraverso le giunzioni intracellulari nelle pareti vascolari, situandosi negli strati più superficiali dell'intima. Qui i monociti differenziano in macrofagi tissutali e, in seguito all'interazione con le lipoproteine circolanti del plasma, possono accumulare lipidi (2, 3). I lipidi, principalmente rappresentati da colesterolo estere, si aggregano in gocce lipidiche citoplasmatiche che conferiscono al macrofago un aspetto di cellula schiumosa, traduzione italiana del più usato e noto termine di *foam cell*. Un agglomerato vasale di *foam cells* rappresenta la forma più precoce di lesione vascolare ed è definita *fatty spots*; quest'ultima può dare inizio alla formazione della stria lipidica (4). In fase avanzata, l'alterazione derivante all'apparato cardiovascolare è caratterizzata dalla presenza di ateromi, formazioni ricche di lipidi liberi ed endocellulari, in un'area dell'intima vasale parzialmente necrotica e ricca di detriti cellulari (5).

I lipidi, a causa della loro natura idrofobica, non possono circolare liberi nel sangue, ma sono veicolati dalle lipoproteine, complessi macromolecolari idrosolubili costituite da una miscela di lipidi e apoproteine (6). Le lipoproteine circolanti interagiscono con le cellule della parete vasale e ne possono influenzare la funzione. Sono dette aterogene le lipoproteine che possono determinare l'accumulo di lipidi nel macrofago. Le lipoproteine alle quali si riconosce un ruolo aterogeno sono le LDL, lipoproteine endogene con funzione di trasporto e distribuzione del colesterolo alle cellule periferiche. Da oltre 20 anni studi epidemiologici, clinici, di base e lo studio di dislipidemie su base genetica indicano che le LDL sono un fattore di rischio per le malattie cardiovascolari (7, 8). Acquisizione più recente è che anche i *remnant* dei chilomicroni (CR), le lipoproteine deputate al trasporto dei lipidi esogeni assunti con la dieta, inducono accumulo di lipidi nel macrofago e sono pertanto da considerare lipoproteine aterogene (9, 10).

I fattori che modulano l'interazione tra il macrofago e le lipoproteine aterogene sono molteplici, solo parzialmente esplorati e includono la funzione endoteliale, i processi infiammatori, e i processi correlati alla ossidazione (11-13). I processi ossidativi sono una importante concausa nel processo di formazione delle *foam cells* e possono influenzare l'interazione tra macrofagi e lipoproteine con numerosi meccanismi.

## Lipidi e ossidazione

Gli acidi grassi sono la classe lipidica più semplice, costituenti essenziali dei lipidi complessi (es. trigliceridi, colesterolo estere, fosfolipidi, sfingolipidi ecc.). Sono un target ossidabile presente in ogni classe lipidica, ad eccezione del colesterolo. I doppi legami presenti negli acidi grassi insaturi, infatti, rappresentano il target principale dell'attacco dei radicali liberi (ossidazione 1e) e dell'ossidazione lipidica. Una volta iniziata la lipoperossidazione, si innesca una reazione a catena che porta all'amplificazione del numero di lipoperossidi, associato ad un riarrangiamento dei doppi legami degli acidi grassi, con la formazione precoce dei dieni coniugati. Come conseguenza della propagazione della reazione si ha la formazione di intermedi altamente reattivi, quali ad esempio aldeidi e chetoni, che, a loro volta, reagiscono con i componenti lipidici e proteici delle lipoproteine (14).

Dall'ossidazione del colesterolo derivano gli ossisteroli. Gli ossisteroli presenti negli organismi sono prodotti di reazione enzimatica o derivati dall'attacco radicalico del colesterolo (15).

Anche i liso-lipidi (es. lisofosfolipidi, liso-glicerolipidi ecc) rappresentano derivati ossidati dei lipidi presenti nelle strutture biologiche (16).

Molti dei derivati ossidati presenti nell'uomo sono importanti prodotti intermedi del metabolismo, e/o mediatori di *cell signalling* e/o modulatori di espressione genica (es. intermedi di sintesi di ormoni steroidei e acidi biliari, eicosanoidi ecc.), tuttavia, gran parte dei lipidi ossidati derivati dall'azione radicalica, possono svolgere un'azione tossica e/o potenzialmente patologica sulle cellule della parete vascolare e svolgere un ruolo rilevante nello sviluppo dell'arteriosclerosi (17-20).

## Lipoproteine aterogene e formazione delle *foam cells*

Le LDL plasmatiche sono internalizzate dalle cellule per endocitosi mediata dal recettore LDL (21). Il recettore LDL è ubiquitario e la sua espressione/funzione è *down-regulated* dai livelli intracellulari di colesterolo. L'auto-regolazione dell'attività del recettore LDL previene l'accumulo cellulare di colesterolo. Tuttavia, i livelli di LDL, e in particolare del colesterolo trasportato dalle LDL, rappresentano il principale fattore di rischio di malattie cardiovascolari (7) ed, infatti, la riduzione farmacologica dei livelli di colesterolo-LDL si associa a diminuzione del rischio (8). D'altra parte, le lesioni aterosclerotiche si sviluppano anche nei soggetti con ipercolesterolemia familiare, soggetti geneticamente deficitari del recettore LDL funzionale (21). Quindi il recettore LDL non può essere il recettore responsabile dell'*uptake* delle LDL che si accumulano nel macrofago delle pareti vasali durante lo sviluppo della lesione ateromatosa. È infatti concetto acquisito che le LDL, per indurre accumulo lipidico e la trasformazione del macrofago in *foam cells*, devono subire delle modificazioni che le rendano irrecognoscibili al recettore LDL. Le LDL modificate sono rimosse dal circolo dai recettori *scavenger* (22-24). I recettori *scavenger*, diversamente dal recettore LDL, non sono *down-regulated* dai livelli di colesterolo, quindi continuano a veicolare l'entrata delle LDL nei macrofagi anche quando i livelli intracellulari di colesterolo sono elevati (22, 23). Mentre le LDL modificate chimicamente in laboratorio, quali le LDL acetilate (acLDL), costituiscono un importante modello per studiare la formazione delle *foam cells* (22), le modificazioni di tipo ossidativo sono ritenute "modificazioni fisiologiche" che possono avvenire *in vivo* (11, 16, 17, 25).

I remnant dei chilomicroni (CR) sembrano indurre la formazione delle *foam cells* e contribuire al processo di aterogenesi in modo diverso dalle LDL (9). I trigliceridi alimentari

sono assunti dagli enterociti dopo esser stati idrolizzati durante la digestione in acidi grassi liberi e monogliceridi. Nell'enterocita i lipidi assunti con la dieta sono assemblati con l'apolipoproteina B48 a formare i chilomicroni. I chilomicroni secreti dall'enterocita sono grandi complessi lipoproteici il cui contenuto è rappresentato per l'80-90% dai trigliceridi. Raggiunto il circolo ematico, parte dei trigliceridi è idrolizzata dalla lipoprotein lipasi endoteliale e i chilomicroni sono oggetto di una serie di trasformazioni dinamiche che li trasforma in CR (26). In condizioni fisiologiche i *remnant* sono rimossi rapidamente dal circolo dal fegato e tale lipoproteina è presente nel plasma solo nella fase post-prandiale (26, 27). Tuttavia, nelle persone in cui il tempo di residenza in circolo è prolungato, si creano le condizioni per una deposizione dei lipidi alimentari nella parete vasale. Infatti, individui con iperchilomicronemie sviluppano aterosclerosi precoce, nonostante i bassi livelli di LDL circolanti (28-29). Inoltre, i remnant dei chilomicroni, al pari delle LDL, possono penetrare nella parete arteriosa e restare intrappolati nello spazio sub-endoteliale dove interagiscono con le cellule della parete vasale (30-34). Le interazioni dei chilomicroni *remnants* con le cellule della parete vasale sono state recentemente recensite (35).

## LDL: ossidazione e aterogenesi

L'ossidazione delle LDL gioca un ruolo rilevante nell'aterogenesi (17, 23, 36). Le LDL ossidate (oxLDL), cioè LDL che hanno subito un processo ossidativo a carico di un qualsiasi suo componente, posseggono *in vitro* un ampio spettro di attività pro-aterogeniche che includono la capacità di interagire con i recettori *scavenger* e indurre la formazione di *foam cells* (18-20, 22-24).

Le lesioni ateromasiche, sia spontanee sia sperimentalmente indotte, sono caratterizzate dalla presenza di lipoproteine ossidate (36) e ossisteroli (37). Tuttavia, la presenza delle oxLDL sembra confinata alle placche aterosclerotiche, e non esistono prove convincenti di un aumento di idroperossidi lipidici nel plasma umano (38). Si ritiene, quindi, che il processo di lipoperossidazione avvenga *in vivo* nel contesto della lesione aterosclerotica, principalmente a livello dell'intima vasale (17). Infatti, gli antiossidanti plasmatici proteggono le lipoproteine dalla lipoperossidazione mentre, nel microambiente vasale le LDL, meno protette dagli antiossidanti circolanti, sono esposte all'azione ossidante determinata dalla attività macrofagica e dall'endotelio. I lipoperossidi generati dalle lipossigenasi intracellularmente sono poi trasferiti alle LDL. La 15-lipossigenasi sembra l'enzima principalmente coinvolto nell'azione di ossidare i lipidi cellulari, i quali sono successivamente trasferiti alle LDL presenti nell'ambiente extracellulare, iniziando una reazione a catena che ossida le LDL in modo molto esteso (39). Inoltre, è ritenuto altrettanto probabile il meccanismo di ossidazione diretta dei lipidi delle LDL durante l'interazione LDL-cellula, mediato dalla secrezione di anioni superossidi e/o molecole pro-ossidanti (ossidazione 1e e 2e) (14, 38-40).

## Antiossidanti e processi di lipoperossidazione

Il meccanismo più accreditato di formazione delle *foam cells* è quello strettamente connesso con le modificazioni ossidative delle LDL le quali sono in grado di promuovere l'entrata delle LDL mediata dai recettori *scavengers* (22-24). Pertanto, "l'ipotesi antiossidante nell'aterosclerosi" suggerisce una relazione tra il livello di antiossidanti e la prevenzione dei

danni da lipoperossidazione (25, 41). In accordo con tale ipotesi la supplementazione dietetica con antiossidanti è stata proposta per la prevenzione delle malattie cardiovascolari (42, 43).

Numerose evidenze epidemiologiche suggeriscono, infatti, che una dieta ricca di frutta e verdura, contenente alti livelli di vitamina E e carotenoidi, riduce il rischio di malattia cardiovascolare (44, 45). I meccanismi attraverso i quali gli antiossidanti potrebbero proteggere dall'aterosclerosi sono molteplici, tuttavia particolare importanza è attribuita alla capacità degli antiossidanti di fungere da *scavenger* dei radicali liberi e ostacolare l'ossidazione delle LDL (46). Tuttavia, nonostante molti studi *in vitro* dimostrano che gli antiossidanti possano aumentare la resistenza delle LDL all'ossidazione, numerose altre prove sperimentali non supportano l'ipotesi che la concentrazione di antiossidante nel plasma e/o nel microambiente vascolare sia determinante nell'induzione del danno ossidativo alle LDL (40).

Inoltre, nonostante le solide indicazioni epidemiologiche del potenziale beneficio derivante dal consumo di diete ad elevato contenuto di antiossidanti, le recenti *reviews* degli studi clinici di supplementazione alimentare con vitamina E o  $\beta$ -carotene nell'uomo indicano che i dati disponibili non supportano alcun effetto protettivo di questi composti sulla malattia cardiovascolare (47, 48). Quindi, allo stato attuale delle conoscenze, il meccanismo di potenziale beneficio degli antiossidanti resta non chiarito, ma, è evidente, che esso va esplorato oltre la capacità di prevenire il danno ossidativo a carico delle LDL (40, 49).

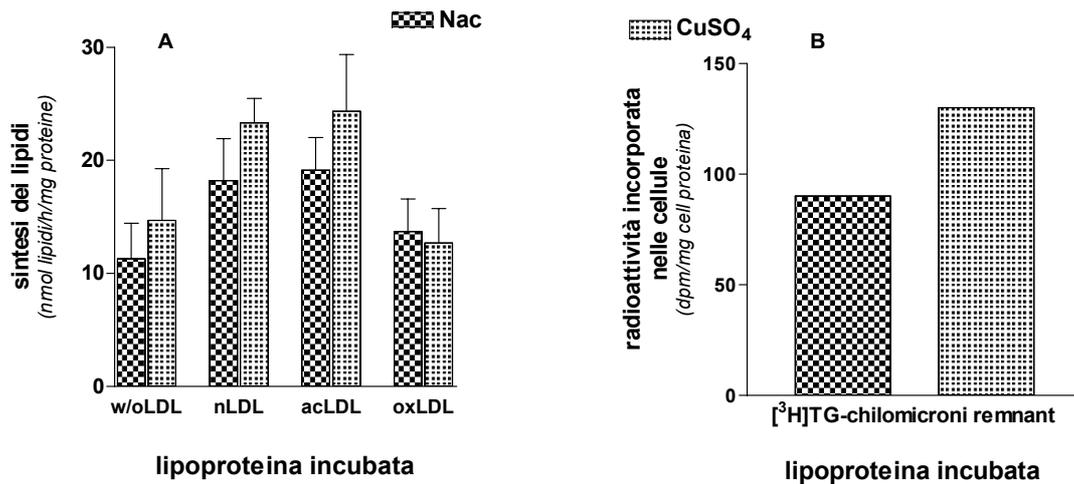
## **Bilancio redox intracellulare e formazione delle *foam cells***

Il bilancio redox intracellulare, determinato dalla sommatoria dei meccanismi biochimici, enzimatici e di regolazione metabolica, determina la capacità cellulare di proteggersi dai danni indotti dai radicali liberi dell'ossigeno (ROS) (16, 38). I danni indotti dai ROS nei macrofagi includono la produzione di radicali liberi, la lipoperossidazione e il rilascio di mediatori dell'infiammazione. Il trattamento con diversi antiossidanti, agendo sui meccanismi che operano nelle cellule, le proteggono dai danni indotti da ROS aumentandone il potenziale pro-riducente (11, 38).

Il ruolo delle modificazioni del profilo redox della cellula sull'interazione tra macrofagi e LDL e sulla formazione delle *foam cells* è stato investigato dal nostro gruppo in una serie di studi. Una breve descrizione dei principali metodi e test utilizzati in questi studi sono riportati nell' Appendice 1, mentre per una descrizione completa dei metodi e risultati si rimanda alle relative referenze.

L'equilibrio intracellulare tra il glutatione (GSH) e il glutatione ossidato rappresenta uno dei principali indicatori di potenziale redox (38) in grado di modulare il danno ossidativo alle LDL indotto dai macrofagi (13). N-acetilcisteina (Nac) è un pro-riducente che esplica la sua attività attraverso 2 meccanismi: l'induzione della sintesi intracellulare di GSH, e la neutralizzazione dei radicali liberi a livello extracellulare (50). Di converso, il rame è un agente pro-ossidante che riduce i livelli dei tioli intracellulari. Uno dei modelli cellulari da noi utilizzato sono macrofagi umani primari derivati per differenziamento da monociti circolanti (*human monocyte derived macrophages*; HMDM). Trattando HMDM per 24 ore con Nac (5mM) o CuSO<sub>4</sub> (2.5 $\mu$ M) il potenziale redox è significativamente modificato rispettivamente in senso pro-riducente o pro-ossidante, in rapporto a cellule non trattate. Tuttavia, le modificazioni del bilancio ossidativo indotte con tali manipolazioni sono di lieve entità e non assimilabili a condizioni di stress ossidativo cellulare (51). Per valutare l'effetto delle variazioni del potenziale redox sulla formazione di *foam cells* si è quindi valutata la sintesi di lipidi indotta da

LDL non modificate (native) o modificate (acLDL e oxLDL) in HMDM pretrattati con Nac o  $\text{CuSO}_4$ . HMDM, pre-trattati per 24 ore con Nac 5mM o  $\text{Cu}^{2+}$  2.5  $\mu\text{M}$ , sono stati successivamente incubati per 6 ore a 37 °C con nLDL, acLDL, oxLDL (50mg proteina/ml) o senza LDL (w/o) in presenza di [ $^3\text{H}$ ]oleato. La sintesi dei lipidi è stata valutata mediante la incorporazione del substrato marcato [ $^3\text{H}$ ]oleato nel colesterolo estere (CE), trigliceridi (TG) e fosfolipidi (PL). Dopo l'incubazione i lipidi sono stati estratti e separati per cromatografia su strato sottile per determinare la radioattività associata alle diverse classi lipidiche (51). Una sintesi di alcuni risultati è riportata nel pannello A della Figura 1 (i dati sono espressi come media  $\pm$  sd; n=4). I risultati (nmoli di lipide/h/mg proteina) sono espressi come la somma della quantità di CE, TG e PL prodotti.



**Figura 1. Effetto della modificazione dello stato redox intracellulare sul metabolismo dei lipidi nei macrofagi**

Ciò indica, che i prodotti ossidati trasportati dalle oxLDL all'interno della cellula, hanno una maggiore capacità regolatoria rispetto a quella che si può ottenere mediante la modificazione del potenziale redox intracellulare (51). Quest'ultimo, d'altra parte, è in grado di alterare il rapporto tra l'enzima esterificante del colesterolo (ACAT: Acil coenzimaA colesterolo acil transferasi) e quello idrolasico (CEH: colesterolo estere idrolasi) (dati non mostrati) favorendo nei macrofagi pro-ossidati l'accumulo di colesterolo in forma libera rispetto a quella esterificata (51).

Analoghe modificazioni del potenziale redox con Nac e  $\text{CuSO}_4$  ottenute sugli HMDM sono state indotte sulla linea macrofagica murina J774, utilizzata per studiare il ruolo del bilancio tiolico intracellulare nella interazione del macrofago con i CR (52). I CR murini marcati sui trigliceridi sono stati isolati da linfa toracica raccolta mediante incannulamento del dotto toracico di ratti Wistar (53). Nel pannello B della Figura 1 sono riportati, a titolo esemplificativo, i risultati di un esperimento di incubazione dei CR, marcati sulla componente trigliceridica, con J774 pre-trattate con Nac 5mM o  $\text{CuSO}_4$  2.5 $\mu\text{M}$  per 24 ore e incubati successivamente per 4 ore con 30  $\mu\text{g}$  di colesterolo/ml trasportato da *remnants* dei chilomicroni murini marcati sui trigliceridi ([ $^3\text{H}$ ]TG-chilomicrone remnant). Dopo l'incubazione i lipidi sono estratti e separati per cromatografia su strato sottile per determinare la radioattività associata a CE, TG, PL e acidi grassi liberi (52). I dati riportati in figura sono espressi come sommatoria della radioattività associata ai lipidi cellulari e sono relativi a quelli di un singolo esperimento. L'andamento mostrato in figura è risultato consistente sia nei 3 esperimenti eseguiti sia alle 3

diverse concentrazioni di CR testate. Infatti, l'incorporazione del marcato trasportato da 10, 30 o 80 $\mu$ g di colesterolo trasportato dai CR marcati nelle cellule è risultata in media 19-30% più elevata in macrofagi pro-ossidati rispetto a quelli trattati con Nac, a tutte le concentrazioni testate (52). In particolare, l'incorporazione dei CR nelle cellule trattate con CuSO<sub>4</sub> è risultata significativamente maggiore di quella in cellule pro-ridotte a entrambe le concentrazioni di 30 e 80 $\mu$ g di colesterolo-CR (52).

La maggiore incorporazione di lipidi, causato dai *remnants* nelle cellule pro-ossidate, determina un incremento dei lipidi cellulari soprattutto a carico dei trigliceridi, indicando che il trigliceride oltre che il colesterolo, possono contribuire all'incremento dei lipidi che si accumulano nei macrofagi in seguito all'interazione con le lipoproteine di origine alimentare (52). Inoltre, studi sugli epatociti (54) e sugli enterociti (55), cellule con un ruolo essenziale rispettivamente, nel modellamento delle lipoproteine endogene e nell'assorbimento dei lipidi alimentari, hanno mostrato che, variazioni anche modeste dell'equilibrio GSH ridotto/ossidato, sono in grado di modulare il metabolismo lipidico. Tuttavia, la modulazione indotta dalla Nac sul potenziale redox intracellulare è riconducibile a variazioni farmacologiche, mentre grande enfasi nella prevenzione del rischio cardiovascolare è posta sugli antiossidanti naturali (25, 44, 45). Le maggiori informazioni sugli effetti degli antiossidanti naturali e la formazione delle foam cell derivano dagli studi con  $\alpha$ -tocoferolo. Gli studi *in vitro* riportano risultati contrastanti (56, 57) e indicano la necessità di una maggiore attenzione ai modelli sperimentali utilizzati (58, 59).

In uno studio in fase di completamento abbiamo valutato l'effetto dell' $\alpha$ -tocotrienolo nella formazione di *foam cell* indotta da LDL native e modificate. L' $\alpha$ -tocotrienolo è un antiossidante membro della famiglia della vitamina E con capacità di proteggere dal danno indotto dai ROS (59). Al fine di valutare se il trattamento con l'antiossidante modifica la capacità degli HMDM di accumulare colesterolo estere indotto dalle LDL, gli HMDM sono pre-trattati per 24 h con 5 $\mu$ M  $\alpha$ -tocotrienolo, e quindi incubati con [<sup>3</sup>H]oleato, in assenza (w/o LDL) o in presenza di LDL native e modificate (50 mg proteina/ml). I risultati riportati in Figura 2 (espressi come media  $\pm$  sd, n=5) mostrano che l'esterificazione del colesterolo, indotta dalle nLDL, acLDL e oxLDL è costantemente ridotta nelle cellule pre-trattate con  $\alpha$ -tocotrienolo.

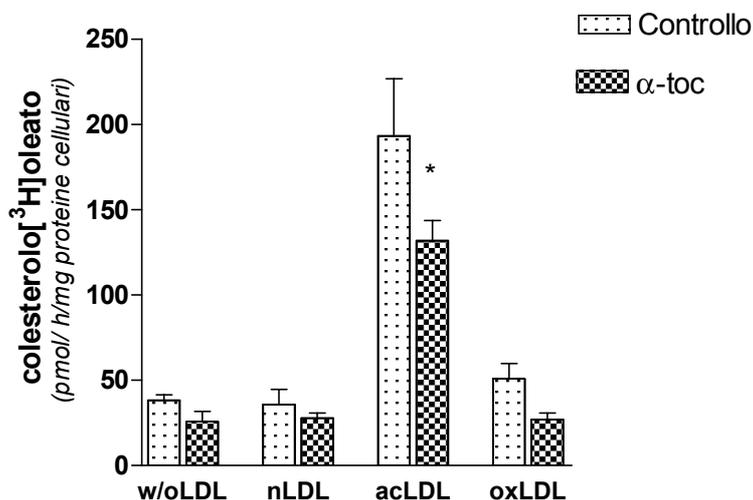


Figura 2. Effetto dell' $\alpha$ -tocotrienolo sull'esterificazione del colesterolo indotta dalle LDL.  
\* $p < 0.05$  vs il controllo della stessa classe lipoproteica

Tale tendenza è rafforzata a concentrazioni maggiori di  $\alpha$ -tocotrienolo (60) ed è marcatamente significativa nel caso delle acLDL. I recettori *scavenger* responsabili per l'*uptake* delle oxLDL sono diversi da quelli per la captazione delle acLDL (61). Pertanto tali risultati suggeriscono un diverso ruolo dell' $\alpha$ -tocotrienolo sulla modulazione dei diversi sistemi recettoriali. I risultati di esperimenti in corso indicano anche che il trattamento con  $\alpha$ -tocotrienolo è in grado di diminuire quantitativamente l'accumulo di colesterolo estere indotto nel macrofago dalla interazione con le LDL. Tuttavia, almeno parte di questi effetti sembra attribuibile all'inibizione della neosintesi di colesterolo da parte dell' $\alpha$ -tocotrienolo (dati degli autori). In conclusione, questi studi indicano che le risposte metaboliche del macrofago trattato con antiossidanti all'interazione con le LDL sono variegata e non univoche. In generale, si osserva un decremento dell'accumulo lipidico nel macrofago in seguito ad innalzamento del potenziale pro-riducente e, soprattutto, si osserva un aumento più consistente di deposito lipidico nelle cellule con ridotte difese verso gli ossidanti.

Tuttavia, tali variazioni sono in genere di entità limitata e spesso imputabili ad attività diverse da quelle antiossidanti, quali la riduzione della sintesi lipidica e/o l'attenuazione delle risposte infiammatorie. Pertanto, questi studi indicano la necessità di una maggiore conoscenza sulle proprietà singole delle molecole antiossidanti e della loro capacità di modulare le funzioni del macrofago nelle varie fasi di progressione della lesione aterosclerotica. Infatti, la variazione del solo potenziale redox intracellulare non è sufficiente ad incrementare in maniera significativa l'accumulo lipidico nel macrofago indotto dalle LDL.

## **Chilomicroni *remnant* (CR), ossidazione e formazione delle *foam cells***

L'acquisizione che i CR possano svolgere un ruolo aterogeno (v. paragr. Lipoproteine aterogene e formazione delle *foam cells*) è più recente rispetto a quello di rischio cardiovascolare dipendente dai livelli di LDL. Questo ritardo è in parte dovuto al fatto che i CR sono lipoproteine post-prandiali (26) e la loro concentrazione/permanenza in circolo dipende dal numero e composizione dei pasti giornalieri. I grassi alimentari, in termini di quantità, tipo, grado di insaturazione (numero dei doppi legami), nonché le modalità di cottura, taglio e conservazione degli alimenti, determinano sia i livelli circolanti di CR sia il loro contenuto in lipidi ossidati, derivati proprio dalla assunzione dietetica (15). È stato, infatti, dimostrato che i lipidi ossidati alimentari sono assorbiti nell'intestino e trasportati in circolo dai chilomicroni e CR (62).

Poiché il potenziale aterogeno delle LDL si correla con le modificazioni biochimiche a cui sono soggette, con una serie di studi abbiamo investigato il ruolo dei CR e delle modificazioni ossidative dei CR sulla induzione di *foam cells*. Vari modelli cellulari sono stati usati per questi studi: HMDM e THP-1, come macrofagi di origine umana o le J774 quale linea macrofagica murina. Negli esperimenti con J774 le cellule sono state testate con CR murini (53). Negli esperimenti con cellule umane, data la difficoltà di isolare CR sufficientemente puri da plasma umano (26, 35), abbiamo utilizzato un modello di *chylomicron-remnants like particles* (CRLP) (63) contenenti apolipoproteina E umana per il riconoscimento specifico recettoriale di tali particelle (64). I risultati sull'accumulo di colesterolo totale e trigliceridi indotto da CR e CR-ossidati mediante trattamento con rame (10 $\mu$ M, 18 ore) in cellule J774, sono riportati in Figura 3. Macrofagi murini J774 sono incubati per 4 ore con, o senza (w/o CR), 10 $\mu$ g colesterolo/ml chilomicroni remnant murini nativi (nCR) o ossidati (oxCR). Al termine della incubazione i lipidi cellulari sono estratti e il contenuto di colesterolo totale (TCH) e trigliceride (TG) determinato enzimaticamente.

Come mostrato in Figura 3 (i dati sono espressi come media  $\pm$  sd, ; n=4), l'interazione con i CR induce nel macrofago un incremento marcato del colesterolo cellulare, ma sono soprattutto i trigliceridi che si accumulano (34). Infatti, come verificato in diversi modelli cellulari di macrofago, l'entrata dei CR causa un aumento dose-dipendente della sintesi macrofagica di trigliceridi, mentre l'esterificazione intracellulare del colesterolo non viene stimolata (34, 52, 63, 65, 66).

Tuttavia, sia i CR che i CR ossidati inducono le medesime risposte metaboliche, mostrando che l'ossidazione dei componenti lipidici della particella non altera la capacità dei CR di indurre accumulo lipidico nel macrofago (34). Mediante il trattamento con rame dei CR si induce una ossidazione cospicua a carico di tutte le classi lipidiche. Tuttavia, la nostra dieta è particolarmente ricca di ossisteroli, prodotti di ossidazione del colesterolo, presenti in quantità rilevante nelle lesioni aterosclerotiche (15, 37). Per verificare se gli ossisteroli assunti con la dieta modulano la formazione delle foam cells, abbiamo valutato l'effetto dell'incorporazione degli ossisteroli maggiormente rappresentati nella dieta umana (7-idrossicolesterolo e 7-chetosterolo) sull'accumulo di lipidi negli HMDM. I risultati da noi ottenuti confermano che i CR inducono accumulo di trigliceridi e colesterolo nei macrofagi umani, ma che tali incrementi non sono modificati dalla presenza di 7-idrossicolesterolo e 7-chetosterolo nei CR (dati degli autori).

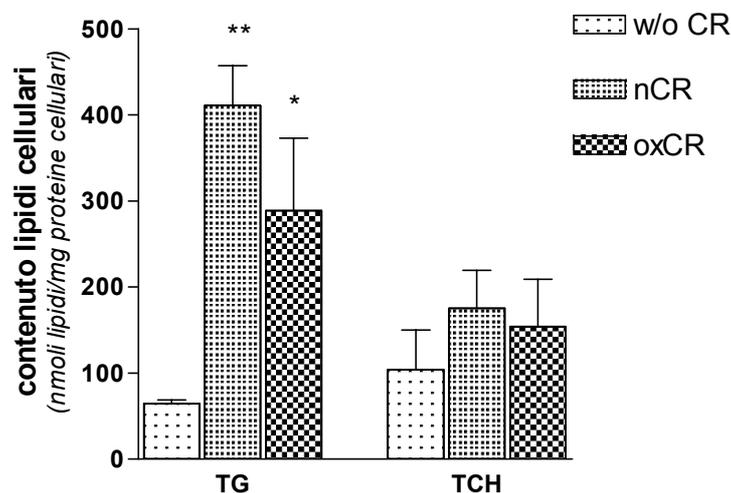
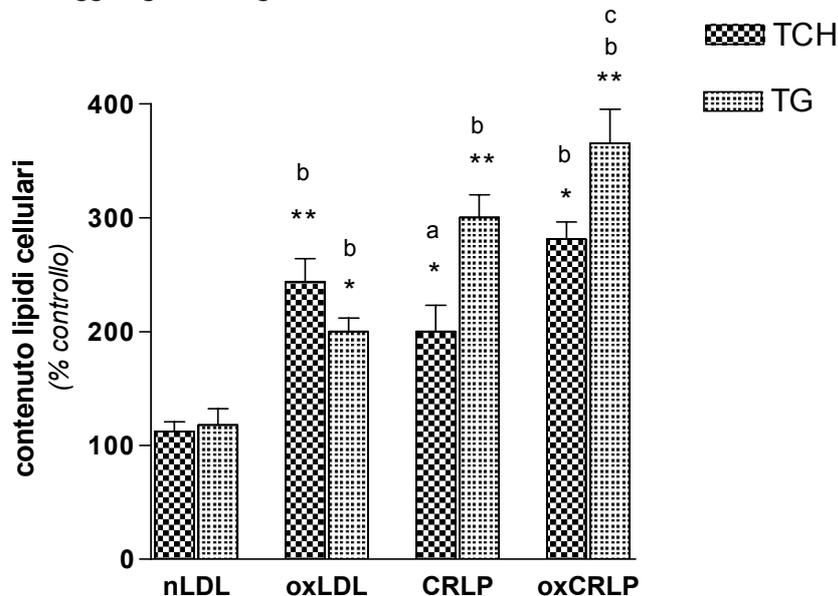


Figura 3. Accumulo lipidico nei macrofagi indotto da remnant dei chilomicroni (CR).  
\* <math><0.05</math> vs w/o CR; \*\*<math><0.01</math> vs w/o CR

Quindi, l'ossidazione lipidica non influenza la capacità di indurre *foam cell* da parte dei CR, ma questa può essere alterata dalla composizione in acidi grassi dei *remnants*, che rispecchiano la composizione dei grassi alimentari (53). Per esempio, i CR particolarmente ricchi in acidi grassi poli-insaturi della serie n-6 (olio di mais), inducono nel macrofago una sintesi di trigliceridi maggiore rispetto a quelli arricchiti con acidi grassi poli-insaturi della serie n-3 (olio di pesce) (34). Inoltre, il tipo di grasso prevalente nella dieta è anche in grado di modulare la propensione all'ossidazione dei CR. In particolare, CR ricchi in acidi grassi poli-insaturi della serie n-3 posseggono una resistenza maggiore all'attacco dei radicali liberi rispetto a CR arricchiti con acidi grassi poli-insaturi della serie n-6 (67).

Risultati complessivi sul ruolo svolto dalle lipoproteine aterogene e la loro ossidazione sull'accumulo lipidico indotto nei macrofagi umani sono riportati nella Figura 4 (35). HMDM sono stati incubati per 48 h con 30µg colesterolo/ml trasportati da LDL native (nLDL) o ossidate (oxLDL), o da particelle chilomicroni remnant-like nativi (CRLP) od ossidati (oxCRLP). Dopo l'incubazione il contenuto cellulare di colesterolo totale (TCH) e trigliceridi (TG) è stato determinato sull'estratto lipidico con test enzimatico. I dati sono espressi come media + sd (n >3) della percentuale dei valori ottenuti con HMDM incubati in assenza di lipoproteine (controllo).

I dati sono riportati come % del contenuto totale di lipidi in HMDM incubati in assenza di lipoproteine (controllo). È evidente che sia le LDL modificate, sia i CR inducano la formazione di *foam cells*, anche se gli accumuli relativi di colesterolo e trigliceride variano notevolmente con il tipo di lipoproteina. La maggiore differenza tra LDL e CR è che, mentre la preliminare modificazione delle LDL è necessaria per indurre accumulo lipidico, i CR svolgono attività aterogena anche in forma di *remnant* non ossidata. L'incremento in colesterolo e in trigliceride indotto dalle LDL non modificate è modesto e simile per entrambe le classi lipidiche, mentre la ossidazione delle LDL favorisce la formazione di *foam cells* poiché determina un significativo aumento del contenuto lipidico cellulare rispetto sia al controllo sia alle nLDL. Le ox-CRLP mostrano una capacità più marcata di causare incremento lipidico rispetto alle CRLP, tuttavia le differenze non raggiungono la significatività.



**Figura 4. Effetto della ossidazione sull' accumulo lipidico indotto da lipoproteine aterogene.**  
<sup>\*</sup>p<0.05 vs. controllo; <sup>\*\*</sup>p< 0.01 vs controllo; <sup>a</sup> p<0.05 vs. l'incremento della stessa classe lipidica indotto da nLDL; <sup>b</sup>p<0.01 vs. l'incremento della stessa classe lipidica indotto da nLDL; <sup>c</sup> p< 0.05 vs. incremento dei TG indotto dalle oxLDL

Le LDL differiscono dai CR anche per la composizione biochimica del deposito lipidico indotto nel macrofago. Le oxLDL causano un incremento di colesterolo maggiore dei trigliceridi, mentre i trigliceridi prevalgono se l'accumulo è indotto dalle CRLP. Tuttavia, è interessante notare che gli accumuli di colesterolo dovuti dalle CRLP sono dello stesso ordine di grandezza di quelli causati dalle oxLDL (34, 35, 51, 63, 66).

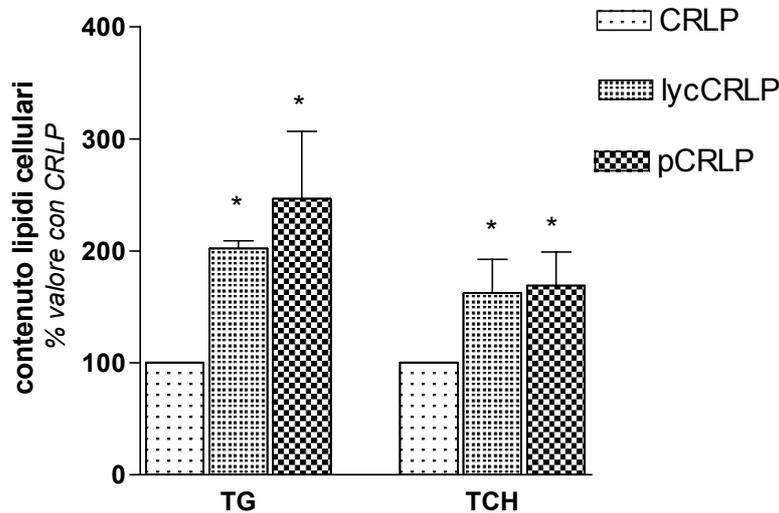
## Antiossidanti e metabolismo dei CR

I chilomicroni, e i CR da loro derivati, sono i veicoli delle sostanze liposolubili presenti nella dieta e quindi anche di tutti gli antiossidanti lipofili naturali assunti durante i pasti. Con lo scopo di valutare se la presenza di antiossidanti nei CR ne modificano la potenzialità aterogena abbiamo iniziato una serie di studi sull'influenza del licopene sul metabolismo dei CR. Il licopene, antiossidante naturale presente in elevata concentrazione nei pomodori rossi, cachi e cocomero, è un carotenoide con elevata capacità di neutralizzare specie radicaliche dell'ossigeno (68) cui si attribuisce un ruolo nella prevenzione dell'arteriosclerosi e delle malattie cardiovascolari (69). La nostra ipotesi di partenza era verificare se gli antiossidanti alimentari naturali diminuivano l'accumulo dei lipidi indotto dalle CRLP nel macrofago. Tuttavia, quando abbiamo studiato gli effetti dell'incorporazione del licopene nelle CRLP sul metabolismo del macrofago, abbiamo evidenziato che la presenza del licopene nelle CRLP raddoppia il contenuto dei trigliceridi e, aumenta del 62% quello del colesterolo, rispetto a cellule incubate con CRLP non contenenti licopene (70). Tale risultato, comunque, lasciava aperto il quesito se tale induzione di deposito lipidico fosse dovuta alle specifiche caratteristiche del licopene o, più in generale, alle proprietà antiossidanti della molecola. Con lo scopo di capire se le sole proprietà antiossidanti delle molecole sono sufficienti a causare un incremento nell'accumulo lipidico indotto da CRLP, abbiamo studiato l'effetto del probucolo, un farmaco fenolico antiossidante strutturalmente diverso dal licopene (71), sulla formazione delle *foam cells*. Per effetto del probucolo il contenuto cellulare del colesterolo, dei trigliceridi e dei lipidi totali aumenta rispettivamente di 2,2, 1,8 e 2,3 volte rispetto a CRLP non contenenti l'antiossidante (65). La presenza di antiossidante causa un'incorporazione delle CRLP nelle cellule più rapida e una maggiore induzione di sintesi dei trigliceridi da parte del macrofago (65). I risultati sull'effetto dell'introduzione del licopene e del probucolo nelle CRLP sul livello di lipidi intracellulari sono riportati in Figura 5 (i dati sono espressi come media + sd, n =5). Cellule della linea monocitica-macrofagica THP-1 sono incubate per 48h con 30µg colesterolo/ml trasportato da CRLP, da CRLP contenenti licopene (lycCRLP) o da CRLP contenenti probucolo (pCRLP). Al termine delle incubazioni il contenuto cellulare di trigliceride (TG) e di colesterolo totale (TCH) è stato determinato sugli estratti lipidici cellulari con metodo enzimatico. I risultati, espressi come percentuale del contenuto lipidico in THP-1 incubate con CRLP non contenenti antiossidante, mostrano che la presenza di antiossidanti nei CR ne aumenta la captazione da parte del macrofago. Poiché non abbiamo evidenziato nessuna differenza significativa nella espressione di geni direttamente correlati al metabolismo delle lipoproteine riconducibile all'effetto degli antiossidanti, la nostra ipotesi è che le variazioni osservate debbano attribuirsi a modulazione post-trascrizionale (65, 70).

## Conclusioni

I fattori che regolano la formazione delle *foam cells* a causa delle LDL sono molteplici e i processi ossidativi ne costituiscono solo un aspetto. Valutare l'azione degli antiossidanti solo in relazione alla loro capacità di funzionare *da scavenger* di radicali liberi è, al momento, riduttivo. Probabilmente un'attenzione maggiore deve essere posta sugli ossidanti a 2e rispetto a quelli 1e (40, 49). Tuttavia, resta il dato epidemiologico forte della correlazione tra diete ricche in antiossidanti naturali e ridotto rischio cardiovascolare. A tal proposito, il sinergismo tra antiossidanti (72) e la modulazione del processo infiammatorio (11, 12) e immunitario (73) sono solo alcuni degli aspetti ancora parzialmente esplorati. In definitiva, poco si conosce ancora sui

meccanismi con cui gli antiossidanti alimentari ci proteggono dallo sviluppo di malattie cardiovascolari. D'altra parte, l'aterogenicità dei CR sembra largamente indipendente dai processi ossidativi, ma altri componenti alimentari da essi trasportati sembrano in grado di modulare la loro capacità di indurre la formazione delle *foam cells*. I nostri dati, riportati nel precedente paragrafo, mostrano che la presenza di antiossidanti nella dieta induce una rapida incorporazione dei CR che li trasportano e producono un marcato aumento dei lipidi del macrofago (Figura 5).



**Figura 5. Effetto degli antiossidanti sull'accumulo di lipidi indotto dai *remnants* dei chilomicroni nel macrofago. \* $p < 0.05$  vs il contenuto in lipide nelle THP-1 incubate con CRLP**

Se tale meccanismo è da considerarsi nocivo a livello del macrofago vasale, dove induce un incremento dei lipidi cellulari, al contrario, potrebbe risultare marcatamente utile se avvenisse anche a livello epatico. Infatti, una rapida rimozione a livello dell'epatocita riduce il tempo di permanenza in circolo dei CR e ne diminuisce il potenziale aterogeno (27,28). La verifica di tale ipotesi è attualmente oggetto di studio presso il nostro laboratorio.

## Bibliografia

1. Ross R. Atherosclerosis: a problem of the biology of arterial wall cells and their interactions with blood components. *Arteriosclerosis* 1981;1:293-11.
2. Osterud B, Bjorklid E. Role of monocytes in atherogenesis. *Physiol Rev* 2003;83:1069-12.
3. Gerrity RG. The role of monocytes in atherogenesis. *Am J Pathol* 1981;103:181-90.
4. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801-09.
5. Kadar A, Glasz T. Development of atherosclerosis and plaque biology. *Cardiovasc Surgery* 2001; 9: 109-21.
6. Assman G. *Lipid metab atheroscler* Schattaner-Verlag 1982. p.1-53.
7. Gould AL, Rossouw JE, Santanello NC, Heyse JF, Furberg CD. Cholesterol reduction yields clinical benefit: impact of statin trials. *Circulation* 1998;97:946-52.

8. Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW, McKillop JH, Packard CJ. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med* 1995;333:1301-07.
9. Mamo JCL. Atherosclerosis as a post-prandial disease. *Endocrinol Metab* 1995;2:229-44.
10. Yu KC, Cooper AD. Postprandial lipoproteins and atherosclerosis. *Front Biosci* 2001;6: D332-54.
11. Steinberg D. Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nat Med* 2002; 8: 1211-17.
12. von der Thusen. JH, Kuiper J, van Berkel TJ, Biessen EA. Interleukins in atherosclerosis: molecular pathways and therapeutic potential. *Pharmac Rev* 2003;5:133-66.
13. Rosenblat M, Aviram M. Macrophage glutathione content and glutathione peroxidase activity are inversely related to cell-mediated oxidation of LDL: *in vitro* and *in vivo* studies. *Free Radic Biol Med* 1998; 24: 305-17.
14. Esterbauer H, Gebicki J, Phul H, Jurgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 1992; 13: 341-90.
15. Schroepfer GJ Jr. Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol Rev* 2000; 80: 361-54.
16. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*, 2nd edition. Oxford University Press, 1990.
17. Parthasarathy S, Santanam N, Auye N. Oxidized low-density lipoprotein, a two-faced Janus in coronary artery disease? *Biochem Pharmacol* 1998;56:279-84.
18. Hessler JR, Robertson AL Jr, Chisolm GM. LDL-induced cytotoxicity and its inhibition by HDL in human vascular smooth muscle and endothelial cells in culture. *Atherosclerosis* 1979; 32:213-29.
19. Marchant CE, Law NS, van der Veen C, Hardwick SJ, Carpenter KL, Mitchinson MJ. Oxidized low-density lipoprotein is cytotoxic to human monocyte-macrophages: protection with lipophilic antioxidants. *FEBS Lett* 1995; 358: 175-78.
20. Uchida K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. *Free Radic Biol Med* 2000; 28:1685-96.
21. Goldstein JL, Basu S K, Brown MS. Receptor-mediated endocytosis of low-density lipoprotein in cultured cells. *Meth Enzymol* 1986;46:241-61
22. Brown MS, Basu SK, Falck JR, Ho YK, Goldstein JL. The scavenger cell pathway for lipoprotein degradation: specificity of the binding site that mediates the uptake of negatively-charged LDL by macrophages. *J Supramol Struct* 1980;13:67-81.
23. Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem* 1997; 272:20963-66.
24. Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, Kamada N, Kataoka M, Jishage K, Sakaguchi H, Kruijt JK, Higashi T, Suzuki T, van Berkel TJ, Horiuchi S, Takahashi K, Yazaki Y, Kodama T. The multiple roles of macrophage scavenger receptors (MSR) *in vivo*: resistance to atherosclerosis and susceptibility to infection in MSR knockout mice. *J Atheroscler Thromb* 1997;4:1-11.
25. Gey KF. On the antioxidant hypothesis with regard to atherosclerosis. *Bibl Nutr Dieta* 1986;37:53-91.
26. Redgrave TG. Chylomicron metabolism. *Biochem Soc Trans* 2004;32:79-82.
27. Groot PHE, Van Stiphout WAH, Kruass XH, Jansen H, van Tol A, van Ramshorst E, Chin-on S, Hofmann A, Cresswell SR, Havekes L. Postprandial lipoprotein metabolism in normolipidemic men with and without coronary artery disease. *Arterioscler Thromb* 1991;11: 653-62.

28. Benlian P, De Gennes PL, Foubert L, Zhang H, Gagne SE, Hayden M. Premature atherosclerosis in patients with familial chylomicronemia caused by mutations in the lipoprotein lipase gene. *New Engl J Med* 1996;335: 848-54.
29. Proctor SD, Mamo JCL. Retention of fluorescent-labelled chylomicron *remnants* within the intima of the arterial wall—evidence that plaque cholesterol may be derived from post-prandial lipoproteins. *Eur J Clin Invest* 1998; 28: 497-03.
30. Grieve DJ, Avella MA, Elliott J, Botham KM. The influence of chylomicron *remnants* on endothelial cell function in the isolated perfused rat aorta. *Atherosclerosis* 1998;139: 273-81.
31. Mamo JCL and Wheeler JR. Chylomicrons or their *remnants* penetrate rabbit thoracic aorta as efficiently as do smaller macromolecules, including low-density lipoprotein, high-density lipoprotein and albumin. *Coronary Artery Dis* 1994;5:695-05.
32. Van Lenten BJ, Fogelman AM, Jackson RL, et al: Receptor-mediated uptake of remnant lipoproteins by cholesterol-loaded human monocyte macrophages. *J Biol Chem* 1985; 260: 8783-88.
33. Yu KC, Mamo JC. Chylomicron remnant-induced foam cell formation and cytotoxicity: a possible mechanism of cell death in atherosclerosis. *Clin Sci* 2000;98:183-92.
34. Napolitano M, Avella M, Botham KM, Bravo E. Chylomicron remnant induction of lipid accumulation in J774 macrophages is associated with up-regulation of triacylglycerol synthesis which is not dependent on oxidation of the particles. *Biochim Biophys Acta* 2003; 163: 255-64.
35. Botham KM, Bravo E, Elliott J, Wheeler-Jones CPD. Direct interaction of dietary lipids carried in chylomicron *remnants* with cells of the artery wall: implications for atherosclerosis development. *Current Pharmaceutical Design* 2005: in press.
36. Kita T, Kume N, Minami M, Hayashida K, Murayama T, Sano H, Moriwaki H, Kataoka H, Nishi E, Horiuchi H, Arai H, Yokode M. Role of oxidized LDL in atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 2001;947:199-05.
37. Brown AJ, Jessup W. Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1999;142:1-28.
38. Sies H, ed. *Oxidative stress: oxidants and antioxidants*. London, Academic Press, 1991.
39. Yamashita H, Nakamura A, Noguchi N, Niki E, Kuhn H. Oxidation of low density lipoprotein and plasma by 15-lipoxygenase and free radicals. *FEBS Lett* 1999;445:287-90.
40. Stocker R, Keane JF Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 2004; 84:1381-78.
41. Marchant CE, Law NS, van der Veen C, Hardwick SJ, Carpenter KL, Mitchinson MJ. Oxidized low-density lipoprotein is cytotoxic to human monocyte-macrophages: protection with lipophilic antioxidants. *FEBS Lett* 1995; 358:175-78.
42. Gey KF. Ten-year retrospective on the antioxidant hypothesis of arteriosclerosis: threshold plasma levels of antioxidant micronutrients related to minimum cardiovascular risk. *J Nutr Biochem* 1995;6:206-36.
43. Stanner SA, Hughes J, Kelly CN, Buttriss J. A review of the epidemiological evidence for the 'antioxidant hypothesis'. *Public Health Nutr* 2004;7 407-22.
44. Trichopoulou A, Vasilopoulou E. Mediterranean diet and longevity. *Br J Nutr* 2000;84:205-09.
45. de Lorgeril M. Mediterranean diet in prevention of coronary heart disease. *Nutrition* 1998;14:55-57
46. Sies H, Stahl W. Vitamins E and C, beta-carotene and other carotenoids as antioxidants. *Am Clin Nutr* 1995; 6:1315S–21S.
47. Vivekananthan D, Penn MS, Sapp SK, Hsu A, Topol EJ. Use of antioxidant vitamins for the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 2003;361:2017-23.
48. Clarke R, Armitage J. Antioxidant vitamins and risk of cardiovascular disease. Review of large scale randomised trials. *Cardiovasc Drugs Ther* 2002; 16: 411-15.

49. Niki E. Antioxidants and atherosclerosis. *Biochem Soc Trans* 2004; 32:156-59.
50. Rivabene R, Viora M, Matarrese P, Rainaldi G, D'Ambrosio A, Malorni W. N-acetyl-cysteine enhances cell adhesion properties of epithelial and lymphoid cells. *Cell Biol Int* 1995;19:681-86
51. Bravo E, Napolitano M, Rivabene R. Role of pre-existing redox profile of human macrophages
52. on lipid synthesis and cholesteryl ester cycle in presence of native and acetylated and oxidised LDL. *J Ster Biochem Mol Biol* 2001;77: 73-81.
53. Napolitano M, Rivabene R, Avella M, Botham KM, Bravo E. The internal redox balance of the cells influences the metabolism of lipids of dietary origin by J774 macrophages: implications for foam cell formation. *J Vas Res* 2001;38: 350-60.
54. Bravo E, Flora L, Cantafora A, Tripodi M, De Luca V, Avella M, Botham KM The influence of dietary saturated and unsaturated fat on hepatic cholesterol metabolism and the biliary excretion of chylomicron cholesterol in the rat. *Biochim Biophys Acta* 1998;1390:134-48.
55. Napolitano M, Rivabene R, Avella M, Amicone L, Tripodi M, Botham KM, Bravo E. Oxidation affects the regulation of hepatic lipid synthesis by chylomicron remnants. *Free Radic Biol Med* 2001;30: 506-15.
56. Rivabene R, Napolitano M, Cantafora A, Bravo E. Redox-dependent modulation of lipid synthesis induced by oleic acid in the human intestinal epithelial cell line Caco2. *Exp Biol Med* 2001; 226, 191-8.
57. Asmis R, Jelk J, Vitamin E supplementation of human macrophages prevents neither foam cell formation nor increased susceptibility of foam cells to lysis by oxidized LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20: 2078-86.
58. Shige H, Ishikawa T, Suzukawa M, Nishiwaki M, Yamashita T, Nakajima K, Ito T, Higashi K, Ayaori M, Yonemura A, Nestel P, Nakamura H. Vitamin E reduces cholesterol esterification and uptake of acetylated low density lipoprotein in macrophages. *Lipids* 1998; 33: 1169-75.
59. Asmis R, Llorente VC, Gey KF. Prevention of cholesteryl ester accumulation in P388D1 macrophage-like cells by increased cellular vitamin E depends on species of extracellular cholesterol. Conventional heterologous non-human cell cultures are poor models of human atherosclerotic foam cell formation. *Eur J Biochem* 1995; 233 :171-78.
60. Munteanu A, Zingg JM, Azzi A. Anti-atherosclerotic effects of vitamin E--myth or reality? *J Cell Mol Med* 2004;8: 59-76.
61. Napolitano M, Avanzi L, Manfredini S, Bravo E. Effect of the antioxidant FEAOX6 and FEAOX335 on foam cell formation and inflammatory response. *Atti del "XV International Symposium on Drugs affecting lipid metabolism, Venice 24-27 October 2004* p5.
62. Endemann G, Stanton LW, Madden KS, Bryant CM, White RT, Protter AA. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem* 1993;268:11811-16.
63. Vine DF, Croft KD, Beilin LJ, Mamo JC. Absorption of dietary cholesterol oxidation products and incorporation into rat lymph chylomicrons. *Lipids* 1997; 32:887-93.
64. Napolitano M, Batt KV, Avella M, Bravo E, Botham K. Lipid synthesis in macrophage derived from the human cell line THP-1: modulation of the effect of native and oxidised chylomicron remnant-like particles by estrogen. *Clinical Science* 2001;101: 403-13.
65. Martins IJ, Hone E, Chi C, Seydel U, Martins RN, Redgrave TG. Relative roles of LDLr and LRP in the metabolism of chylomicron remnants in genetically manipulated mice. *J Lipid Res* 2000;41:205-13.
66. Moore EH, Napolitano M, Avella M, Bejta F, Suckling KE, Bravo E, Botham KM. Protection of chylomicron remnants from oxidation by incorporation of probucol into the particles enhances their uptake by human macrophages and increases lipid accumulation in the cells. *Eur J Biochem* 2004;271:2417-27.

67. Batt KV, Avella M, Moore EH, Jackson B, Suckling KE, Botham KM. Differential effects of low-density lipoprotein and chylomicron *remnants* on lipid accumulation in human macrophages. *Exp Biol Med* 2004 ;229:528-37.
68. Napolitano M, Bravo E, Avella M, Chico Y, Ochoa B, Botham KM, Rivabene R. The fatty acid composition of chylomicron *remnants* influences their propensity to oxidation. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2004;14: 241-47.
69. Di Mascio P, Kaiser S, and Sies H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch Biochem Biophys* 1989; 274: 532-38.
70. Rao AV. Lycopene, tomatoes and the prevention of coronary heart disease. *Exp Biol Med* 2002; 227: 908-13.
71. Moore EH, Napolitano M, Prosperi A, Avella M, Suckling KE, Bravo E, Botham KM. Incorporation of lycopene into chylomicron remnant-like particles enhances their induction of lipid accumulation in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 312:1216-19.
72. Niguchi N, Niki E. Phenolic antioxidants: a rationale for design and evaluation of novel antioxidant drugs for atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 2000;28: 1538-46.
73. Messina M, Lampe JW, Birt DF, Appel LJ, Pivonka E, Berry B, Jacobs DR Jr. Reductionism and the narrowing nutrition perspective: time for reevaluation and emphasis on food synergy. *J Am Diet Assoc* 2001;101:1416-19.
74. Shaw PX. Rethinking oxidized low-density lipoprotein, its role in atherogenesis and the immune responses associated with it. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2004;52:225-39.
75. Bravo E, Cantafora A. Enzymatic determination of free and total cholesterol in tissue extracts. *Gior Ital Biochim Clin* 1989,14:141-44.

## Appendice: note metodologiche

### Modelli cellulari

Da leucociti, isolati da buffy coat di sangue umano mediante gradiente di Ficoll-Paque, si purificano i monociti mediante anticorpi antiCD14. I monociti, posti in coltura differenziano spontaneamente in macrofagi e sono usati per gli esperimenti al 10° giorno di coltura (51).

Le linee cellulari J774 (34) e THP-1 (63) sono state usate in accordo alle indicazioni della ATCC.

### Lipidi e Lipoproteine

Le LDL, isolate da plasma umano per ultracentrifugazione in gradiente di densità a step ( $d=1.019-1.063$  g/ml), sono dializzate, filtrate e divise in aliquote. Un'aliquota conservata a 4 °C è usata come native LDL, mentre la restante aliquota è utilizzata per preparare le LDL modificate. Le LDL sono acetilate per ripetute aggiunte di anidride acetica a 4mg/ml di LDL diluite in sodio acetato e le LDL sono ossidate mediante incubazione a 37 °C di 2mg/ml di proteina LDL con 10 $\mu$ M di CuSO<sub>4</sub> per 6 ore (51).

Le CRLP (*chylomicron remnant-like particles*) sono preparate per sonicazione di una miscela di lipidi. Dopo aver scartato le particelle più grandi, le CRLP sono isolate mediante ultracentrifugazione, e successivamente incubate con plasma umano per il trasferimento dell'apolipoproteina E (64). Per la preparazione delle CRLP marcate nella componente lipidica o contenenti antiossidanti, i composti relativi sono aggiunti alla miscela lipidica prima della sonicazione.

I CR sono ottenuti per idrolisi enzimatica di chilomicroni murini isolati da linfa toracica di ratto (53).

Test enzimatici sono stati usati per la determinazione del colesterolo e dei trigliceridi lipoproteici e cellulari (74).

### **Test [<sup>3</sup>H]oleato**

La sintesi di colesterolo estere, dei trigliceridi e dei fosfolipidi è stata determinata mediante incorporazione del precursore marcato ([<sup>3</sup>H]oleato) nelle suddette classi lipidiche. A tal fine, le cellule sono incubate per 6 ore a 37 °C in assenza o in presenza di lipoproteine in medium contenente 0.6mM di acido oleico, 6μCi/ml di [<sup>3</sup>H]oleato e 2% albumina. Al termine delle 6 ore le cellule sono lavate e i lipidi estratti con una miscela di esano:isopropanolo (3:2). Le classi lipidiche sono separate mediante cromatografia su strato sottile, eluite in esano:etere:acido acetico (70:30:1) per la determinazione della radioattività ad esse associata (51).

# LDL OSSIDATE E OMEOSTASI DEL TESSUTO ADIPOSO: POSSIBILI IMPLICAZIONI PATOGENETICHE

Massimo D'Archivio, Beatrice Scazzocchio, Rosaria Vari, Carmela Santangelo, Carmela Filesi, Roberta Di Benedetto, Claudio Giovannini, Roberta Masella  
*Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari*

## Introduzione

L'incremento dell'obesità, i cui tassi di prevalenza sono cresciuti nei paesi europei del 10-40% negli ultimi dieci anni, è senza dubbio legato alle modificate condizioni di vita. Ciò che prima era utile alla sopravvivenza e alla riproduzione ha finito per risultare svantaggioso, anche perché si associa all'adozione di uno stile di vita sempre più sedentario e volto al risparmio del dispendio energetico.

L'obesità si presenta con un carattere di cronicità ed è una malattia multifattoriale nella cui patogenesi sono coinvolti sia fattori genetici che ambientali.

Il problema dell'obesità non è scindibile da quello delle sue complicanze cliniche, infatti essa rappresenta il principale fattore di rischio per le malattie cardiovascolari, per l'ipertensione e per il diabete mellito di tipo 2, ed è inoltre associata ad altre patologie quali calcolosi biliare, gotta, nefrolitiasi e ad alterazioni epatiche su base infiammatoria.

Una parte consistente di questo rischio è attribuita ai disordini metabolici che spesso accompagnano l'obesità, come l'insulino-resistenza, l'iperinsulinemia, le dislipidemie; d'altro canto l'obesità è anche un fattore di rischio indipendente. In realtà i meccanismi con i quali essa opera per esercitare i suoi effetti non sono ancora completamente chiariti, né tanto meno è chiaro il *link* che unisce l'obesità alle sue complicanze.

Molte evidenze sperimentali sono a sostegno dell'ipotesi che lo stress ossidativo possa avere un ruolo importante nella patogenesi della obesità ed è altresì ben nota la associazione tra stress ossidativo, diabete e arteriosclerosi. Studi recenti, condotti anche su casistiche particolarmente ampie, hanno riscontrato una correlazione positiva fra indici di obesità, come BMI e *waist/hip* ratio, e *markers* plasmatici e urinari di stress ossidativo (1-6).

L'obesità è accompagnata da alterazioni metaboliche che si associano ad alterazioni dell'equilibrio redox; inoltre numerosi altri *pathways*, attivati nel tessuto adiposo e associati alla sua attività endocrino-metabolica, possono rappresentare meccanismi attraverso i quali sovrappeso e obesità inducono stress ossidativo. Il tessuto adiposo produce ad esempio: i) citochine infiammatorie, come IL-6 e TNF $\alpha$  che possono indurre massiccia produzione di ROS; ii) leptina che, oltre alla funzione primaria di regolazione dell'assunzione di cibo, è coinvolta sia nella regolazione del metabolismo glucidico e lipidico che nel *signalling* intracellulare, e la cui concentrazione plasmatica correla con il rischio di eventi coronarici e infarto del miocardio.

L'obesità può quindi considerarsi come una condizione morbosa associata ad uno stato proinfiammatorio e proossidante cronico, che potrebbe essere l'elemento chiave nella sua patogenesi e in quella delle sue complicanze. Il mantenimento dell'omeostasi della massa grassa appare un elemento cruciale nella regolazione dell'accumulo di grasso e nell'evitare la comparsa delle principali complicanze (7).

Recenti lavori hanno dimostrato una chiara correlazione tra BMI e LDL ossidate (oxLDL) circolanti (8, 9). Le oxLDL, coinvolte nella patogenesi dell'arteriosclerosi e nei processi infiammatori correlati a patologie cronico-degenerative, possono esercitare, oltre ad una azione

citotossica, una funzione regolatoria su molte attività cellulari, come proliferazione, apoptosi e differenziamento, mediante la modulazione, ad esempio, della produzione di citochine e quella di fattori di trascrizione come PPARs e NF- $\kappa$ B. Tali attività sembrano mediate dal legame con recettori *scavenger* tra i quali il CD36, recettore *scavenger* di classe B espresso anche dal tessuto adiposo.

Lo scopo di questo studio è stato quello di analizzare i rapporti tra oxLDL e tessuto adiposo, valutando in particolare i possibili effetti di tali lipoproteine modificate sul processo di differenziamento dei preadipociti in adipociti maturi.

## Materiali e metodi

### Colture cellulari e differenziamento

Preadipociti murini 3T3-L1 sono stati coltivati in DMEM al 10% di siero fetale di vitello. Il protocollo di differenziamento prevedeva la somministrazione alle cellule, al 70% di confluenza, di una miscela di differenziamento (DMIX) contenente insulina 1 $\mu$ M, desametazone 0,25 $\mu$ M e isobutilmetilxantina 0,5nM, (giorno 0). Dopo 48 ore, al cambio di terreno, veniva aggiunta la sola insulina per altre 48 ore; le cellule sono state quindi mantenute nel terreno di coltura fino al giorno 7. Le oxLDL (50mg/L) erano aggiunte insieme alla DMIX e mantenute nel mezzo di coltura per tutto il periodo di differenziamento. Negli esperimenti con l'anti-CD36, le cellule venivano incubate con un anticorpo monoclonale anti-CD36 (clone 63, Chemicon International, Temecula, CA, USA) 18 ore prima dell'aggiunta della DMIX.

### Isolamento delle LDL dal plasma e loro ossidazione

Le LDL (1,019-1,063g/mL) sono state isolate dal plasma di volontari sani mediante ultracentrifugazione in gradiente di densità. Le LDL native così ottenute sono state ossidate con CuSO<sub>4</sub> 20 $\mu$ M per 18 h a 37 °C. L'ossidazione è stata quindi bloccata mediante EDTA 1mM e refrigerazione a 4 °C.

### RT-PCR e Western Blot

Per tutto il periodo sperimentale (dal giorno 0 al 7), è stato isolato quotidianamente l'RNA totale per valutare, mediante RT-PCR, l'espressione di geni coinvolti nell'adipogenesi, in particolare Pref-1, PPAR $\gamma$  e aP2. Gli amplificati sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel d'agarosio all'1,5%, e visualizzati mediante marcatura con bromuro d'etidio. I livelli di RNA messaggero sono stati misurati mediante un analizzatore di immagini FX (Biorad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) e quantificati utilizzando come gene di riferimento il GAPDH. Le proteine nucleari sono state estratte, separate mediante elettroforesi su gel al 12%, trasferite su una membrana di nitrocellulosa e analizzate utilizzando anticorpi specifici per PPAR $\gamma$ .

### Determinazione della proliferazione cellulare e dell'apoptosi

I preadipociti murini 3T3-L1 sono stati piastrati in pozzetti da 6, contenenti DMEM addizionato con Ultrosor G al 2%. Le cellule preconfluenti sono state trattate con oxLDL 50 mg/L e, dopo un periodo di incubazione di 24 ore, sono state analizzate per attività proliferativa

e apoptosi. La proliferazione è stata valutata mediante l'incorporazione di ( $^{14}\text{C}$ ) timidina. L'apoptosi è stata valutata mediante la positività all'Annexina V con il kit *ApoAlert Annexin V Apoptosis Kit* (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA), e utilizzando lo ioduro di propidio per escludere le eventuali cellule necrotiche.

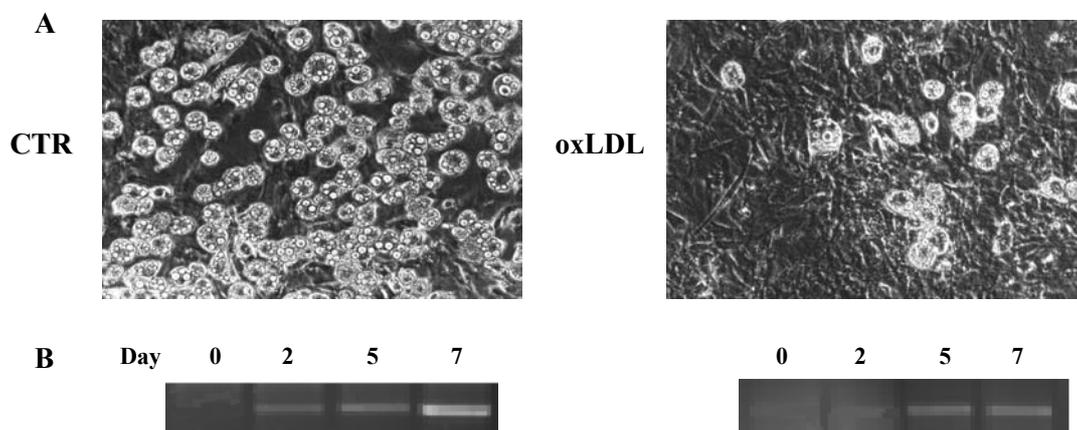
## Risultati e discussione

Il processo di differenziamento è un evento complesso e finemente regolato, nel quale intervengono molteplici fattori di trascrizione e ormoni. L'acquisizione del fenotipo maturo è accompagnato dall'attivazione di numerosi geni, con conseguente comparsa di mRNA definiti precoci, intermedi e tardivi. Uno dei principali *marker* dell'adipogenesi è costituito dal PPAR $\gamma$ , i cui livelli di mRNA cominciano ad essere cospicuamente presenti nella fase intermedia del processo differenziativo. Parallelamente viene repressa l'espressione di geni inibitori dell'adipogenesi, fra i quali il Pref-1.

Durante il processo differenziativo si ha man mano la comparsa del fenotipo adipocitario con espressione di aP2, accumulo di trigliceridi e acquisizione della sensibilità insulinica.

L'analisi morfologica, condotta al microscopio ottico dopo colorazione con Oil Red, ha evidenziato una chiara inibizione del differenziamento al giorno 7 nelle cellule indotte a differenziare in presenza di oxLDL. Durante il differenziamento delle cellule di controllo, si aveva una evidente modifica della forma cellulare, che si arrotondava, l'accumulo di goccioline lipidiche e l'induzione dell'espressione di aP2, *marker* dell'adipocita maturo (Figura 1A).

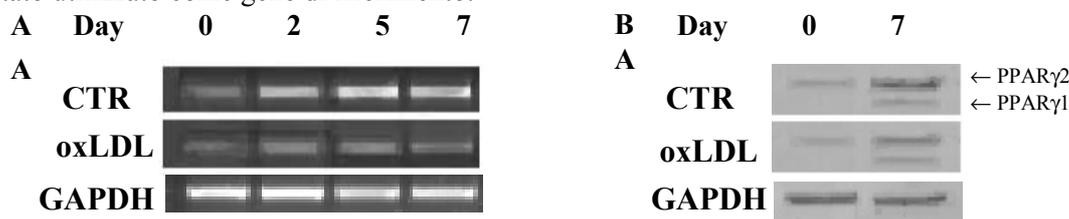
Nelle cellule trattate con oxLDL era presente, invece, un'evidente riduzione dell'accumulo di trigliceridi e assenza, o marcata riduzione, del messaggio per aP2 (Figura 1B). Per verificare se questo ritardo nel differenziamento fosse il risultato di un'alterazione nel programma di differenziamento abbiamo monitorato l'espressione di PPAR $\gamma$  e di Pref-1.



**Figura 1. Effetti delle oxLDL sul differenziamento dei preadipociti murini 3T3-L1.**

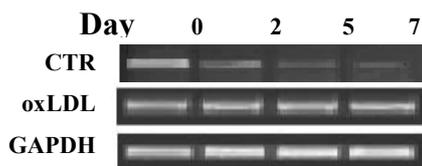
Le cellule di controllo mostravano un rapido incremento della quantità di messaggero per PPAR $\gamma$  che presentava un picco a 2 giorni e si manteneva elevato durante tutto il periodo sperimentale. Nelle cellule trattate con oxLDL, invece, il livello di mRNA per PPAR $\gamma$  rimaneva

sostanzialmente simile a quello iniziale per tutto il periodo di osservazione (Figura 2A). Inoltre l'analisi Western Blot, condotta al giorno 7, evidenziava una significativa riduzione dell'espressione proteica di PPAR $\gamma$  nelle cellule trattate con oxLDL (Figura 2B). GAPDH è stato utilizzato come gene di riferimento.



**Figura 2. Espressione di PPAR $\gamma$  durante il differenziamento di cellule preadipocitarie murine 3T3-L1**

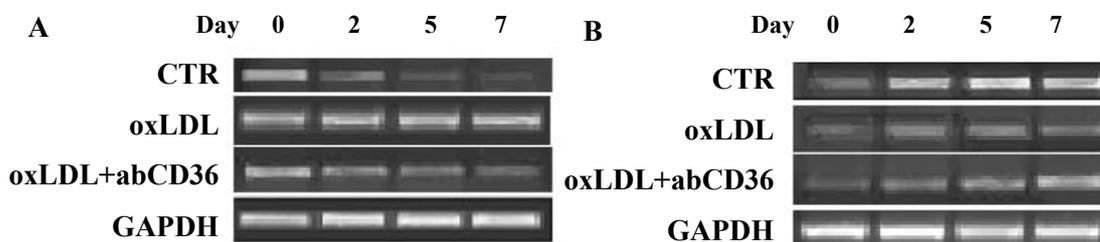
È stata valutata quindi l'espressione del Pref-1, *marker* caratteristico della condizione preadipocitaria, la cui scomparsa è essenziale per la comparsa del messaggero per PPAR $\gamma$ . Le cellule di controllo mostravano una diminuzione progressiva dell'espressione del mRNA di Pref-1, scomparendo quasi del tutto al giorno 7; le cellule trattate con oxLDL, invece, mostravano un significativo incremento del messaggio al giorno 2 rispetto al controllo e al giorno 0, che si manteneva più o meno costante per tutto il periodo di osservazione (Figura 3). GAPDH è stato utilizzato come gene di riferimento.



**Figura 3. Espressione di Pref-1 durante il differenziamento di cellule preadipocitarie murine 3T3-L1**

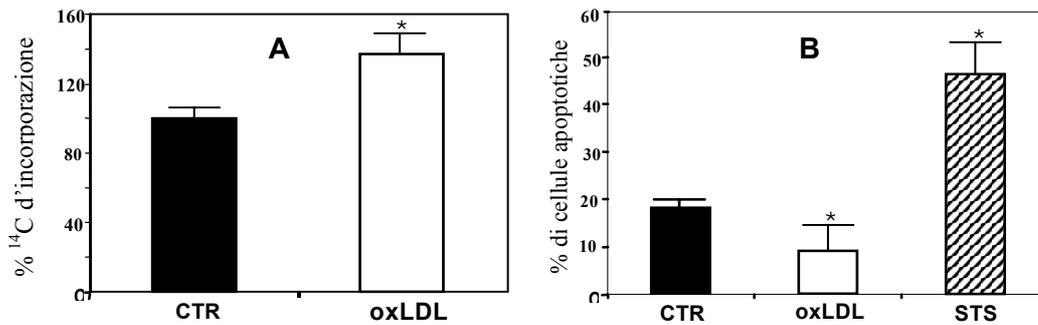
Risultati sovrapponibili sono stati ottenuti utilizzando l'estratto lipidico da oxLDL, indicando un ruolo determinante della componente lipidica.

Per verificare se le oxLDL dovessero essere internalizzate, attraverso il recettore CD36, per esercitare i loro effetti sul differenziamento, le cellule sono state trattate con un anticorpo monoclonale anti-CD36 e successivamente esposte ad oxLDL. La presenza dell'anticorpo preservava la capacità cellulare di differenziarsi, anche in presenza di oxLDL. Sia l'analisi morfologica (dati non mostrati), che l'espressione dei messaggeri dei fattori di trascrizione studiati (Figura 4) hanno dato risultati del tutto comparabili a quelli delle cellule di controllo. GAPDH è stato utilizzato come gene di riferimento.



**Figura 4. Espressione di Pref-1 (A) e di PPAR $\gamma$  (B) durante il differenziamento di cellule preadipocitarie murine 3T3-L1**

Si sono quindi valutati gli effetti delle oxLDL sulla capacità proliferativa e sull'induzione di apoptosi nei preadipociti rispettivamente attraverso i saggi di incorporazione di timidina radioattiva e positività all'annessina V. La presenza di oxLDL non induceva alcun effetto citostatico, anzi determinava un aumento della capacità proliferativa cellulare (Figura 5A). L'analisi quantitativa delle cellule apoptotiche presenti dopo trattamento con oxLDL indicava una significativa diminuzione del fenomeno apoptotico rispetto ai controlli e soprattutto rispetto al controllo positivo rappresentato da cellule trattate con staurosporina (Figura 5B), che confermava la presenza di un *pathway* apoptotico funzionalmente attivo in queste cellule.



**Figura 5. Effetti delle oxLDL sull'attività proliferativa (A) e sull'induzione di apoptosi (B) in cellule preadipocitarie murine 3T3-L1**

In conclusione, i risultati riportati suggeriscono che le oxLDL non esercitano effetti citostatici e citotossici nei preadipociti murini 3T3-L1, ma contribuiscono a mantenere un fenotipo indifferenziato in cellule normalmente *committed* a differenziarsi. Abbiamo, infatti, dimostrato che le oxLDL, e in particolare la loro componente lipidica, ritardano il differenziamento dei preadipociti, probabilmente impedendo la scomparsa del Pref-1, che viene anzi maggiormente espresso. Questo potrebbe determinare la ridotta e ritardata espressione di PPAR $\gamma$  osservata nelle cellule trattate. Le LDL ossidate, pertanto, potrebbero svolgere un ruolo importante nell'alterazione dell'omeostasi del tessuto adiposo contribuendo allo sviluppo di obesità e alla comparsa di insulino-resistenza, riducendo la proporzione di cellule differenziate e quindi insulino-sensibili.

## Bibliografia

1. Keaney JF Jr, Larson MG, Vasan RS, Wilson PW, Lipinska I, Corey D, Massaro JM, Sutherland P, Vita JA, Benjamin EJ; Framingham Study. Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:434-39.
2. Block G, Dietrich M, Norkus EP, Morrow JD, Hudes M, Caan B, Packer L. Factors associated with oxidative stress in human populations. *Am J Epidemiol* 2002;156:274-85.
3. Davi G, Guagnano MT, Ciabattini G, Basili S, Falco A, Marinopicolli M, Nutini M, Sensi S, Patrono C. Platelet activation in obese women: role of inflammation and oxidant stress. *JAMA* 2002;288:2008-14.
4. Dietrich M, Block G, Hudes M, Morrow JD, Norkus EP, Traber MG, Cross CE, Packer L. Antioxidant supplementation decreases lipid peroxidation biomarker F(2)-isoprostanes in plasma of smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11:7-13.

5. Trevisan M, Browne R, Ram M, Muti P, Freudenheim J, Carosella AM, Armstrong D. Correlates of markers of oxidative status in the general population. *Am J Epidemiol* 2001;154:348-56.
6. Beltowski J, Wojcicka G, Gorny D, Marciniak A. The effect of dietary-induced obesity on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and total plasma antioxidant capacity. *J Physiol Pharmacol* 2000;5:883-96.
7. Danforth E Jr. Failure of adipocyte differentiation causes type II diabetes mellitus? *Nat Genet* 2000;26:13.
8. Holvoet P, Mertens A, Verhamme P, Bogaerts K, Beyens G, Verhaeghe R, Collen D, Muls E, Van de Werf F. Circulating oxidized LDL is a useful marker for identifying patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:844-48.
9. Mertens A, Verhamme P, Bielicki JK, Phillips MC, Quarck R, Verreth W, Stengel D, Ninio E, Navab M, Mackness B, Mackness M, Holvoet P. Increased low-density lipoprotein oxidation and impaired high-density lipoprotein antioxidant defense are associated with increased macrophage homing and atherosclerosis in dyslipidemic obese mice: LCAT gene transfer decreases atherosclerosis. *Circulation* 2003;107:1640-46.

# MECCANISMI DI RIPARAZIONE DEL DANNO OSSIDATIVO AL DNA: MODELLI *IN VIVO* E *IN VITRO*

Maria Teresa Russo, Federica Chiera, Margherita Bignami  
Dipartimento Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria

## Meccanismi di riparazione delle basi ossidate del DNA

Il danno ossidativo rappresenta la principale minaccia per l'integrità del genoma nella maggior parte degli organismi viventi. Le specie con ossigeno reattivo (*Reactive Oxygen Species*, ROS) si possono formare come prodotto del normale metabolismo aerobico della cellula, il quale, nonostante sia confinato ai mitocondri, può portare alla formazione di basi ossidate, siti apurinici-apirimidinici (AP) e rotture al DNA.

Due sono le principali basi premutagene che si formano a causa dello stress ossidativo, la 7-idro-8-ossiguanina (8-oxoG) e la 2-idrossi-adenina (2-OH-A). Le elevate caratteristiche mutagene di queste basi ossidate sono la conseguenza della loro capacità di formare appaiamenti diversi da quelli canonici. In particolare la 8-oxoG può appaiarsi anche con la adenina dando luogo a trasversioni GC→TA e AT→CG. La 2-OH-A può appaiarsi in maniera promiscua e dare luogo sia a transizioni che a trasversioni (AT→CG, AT→GC, AT→TA, GC→TA). La 8-oxoG è una lesione particolarmente frequente e la sua pericolosità per la cellula è resa evidente dalla presenza di differenti sistemi di controllo in grado di rimuovere questa base ossidata.

Esistono almeno due braccia complementari del sistema di riparazione per escissione delle basi (*Base Excision Repair*, BER) che agiscono in concerto per minimizzare l'effetto tossico e mutageno della 8-oxoG (Figura 1). La DNA glicosilasi OGG1 del BER è in grado di rimuovere la purina ossidata quando si trova nell'appaiamento 8-oxoG:C, iniziando l'evento di escissione della 8-oxoG presente sul filamento stampo di DNA. Quest'evento porta alla formazione di un sito AP, riconosciuto in seguito da un'AP-endonucleasi che incide il corpo fosfodiesterico del DNA generando un 3'-OH libero che sarà utilizzato dalla polimerasi per inserire il nucleotide corretto. Nel caso in cui durante la replicazione del DNA s'inserisca un'adenina di fronte all'8-oxoG, la DNA glicosilasi MYH rimuove l'adenina ripristinando un appaiamento 8-oxoG:C, ricostituendo in tal modo un substrato per OGG1. Recentemente sono state identificate altre DNA glicosilasi coinvolte nella rimozione di questa base ossidata. Un esempio è la DNA glicosilasi NEIL1, la quale grazie alla sua attività AP-liasica è in grado di rimuovere l'8-oxoG presente in particolari strutture di DNA quali le bolle replicative o trascrizionali, e potrebbe quindi essere particolarmente attiva durante la fase S del ciclo cellulare (1).

Esistono inoltre altri sistemi di riparazione in grado di rimuovere le basi ossidate dal DNA, quali il sistema di riparazione per escissione di basi (*Nucleotide Excision Repair*, NER). Il NER è il principale sistema di riparazione coinvolto nella rimozione del danno causato dalla luce ultravioletta. Ma è stato osservato che, in particolare il prodotto dei geni *CSB* e *XPG* potrebbero essere coinvolti nella rimozione di basi modificate indotte dall'esposizione ad agenti ossidanti sia in sequenze trascritte che non trascritte (2).

La presenza di ROS all'interno di una cellula può causare non solo ossidazione diretta del DNA, ma anche delle purine e/o pirimidine del *pool* dei nucleotidi (dNTPs). I dNTPs ossidati possono essere incorporati nel DNA dalle polimerasi replicative durante la fase di sintesi. Per

evitare questa fonte di danno, nella cellula si è evoluto un sistema di “pulizia” del *pool* dei nucleotidi ossidati. In particolare, nel caso delle purine ossidate questa avviene attraverso un'idrolisi operata da una famiglia di proteine (Nudix). La più studiata nelle cellule umane è l'idrolasi hMTH1, un omologo della proteina MutT di *E. coli* (3). È stato dimostrato che il substrato per il quale hMTH1 presenta una maggiore affinità è il 2-oxo-dATP, seguito da 8-oxo-dATP, e da 8-oxo-dGTP (4). hMTH1 idrolizza l'8-oxo-dGTP a 8-oxo-dGMP e ne impedisce quindi l'incorporazione nel DNA. Si riduce, in questo modo, la possibilità di un'incorporazione della 8-oxoG di fronte a un'adenina, causa di transversioni A:T→C:G (Figura 1).

In conclusione, la presenza di ROS all'interno della cellula può determinare sia una ossidazione diretta della doppia elica del DNA che delle modificazioni di tipo ossidativo dei precursori della sintesi del DNA. L'esistenza di questo possibile duplice bersaglio ha fatto sì che all'interno della cellula si evolvessero dei meccanismi di riparazione capaci di funzionare a questi due differenti livelli per evitare un accumulo di danno ossidativo nel genoma.

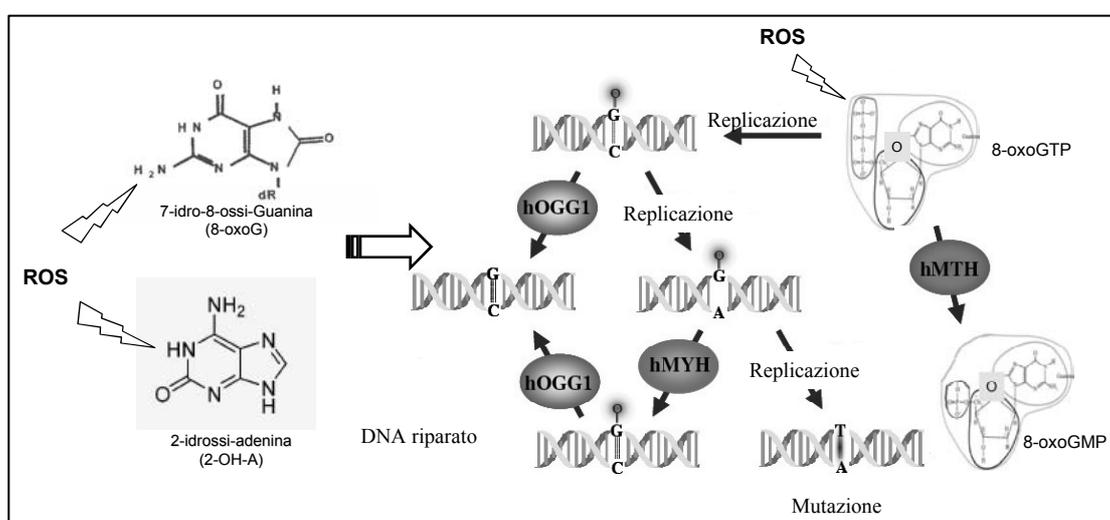


Figura 1. Principali purine ossidate premutagene e loro meccanismi di riparazione

## Accumulo della base ossidata 8-oxoG *in vivo* e formazione di tumori

Il danno ossidativo è stato considerato per decenni un fattore importante nel processo di tumorigenesi, sebbene ancora adesso manchino connessioni causali dirette tra questi due eventi. Infatti, i meccanismi molecolari alla base del processo di trasformazione tumorale indotta da danno ossidativo non sono ancora completamente chiariti.

Una possibile strategia sperimentale per chiarire questo punto consiste nel confronto dei livelli di danno ossidativo basale in animali con differente genotipo e in diversi organi o tessuti. Questo approccio permette quindi di individuare quali siano i genotipi o gli organi particolarmente suscettibili al danno ossidativo e di estrapolare possibili relazioni tra accumulo di danno ossidativo e formazione dei tumori.

I livelli di 8-oxoG quale marcatore di ossidazione spontanea del DNA sono stati misurati negli organi di topi *knock-out* per geni della riparazione del DNA, in fibroblasti embrionali

derivati da questi topi geneticamente modificati e infine in linee cellulari derivate da tumori umani. Una metodica molto sensibile e ampiamente utilizzata per questo fine è la cromatografia ad alta risoluzione accoppiata ad una rivelazione elettrochimica (HPLC-EC) (Figura 2).

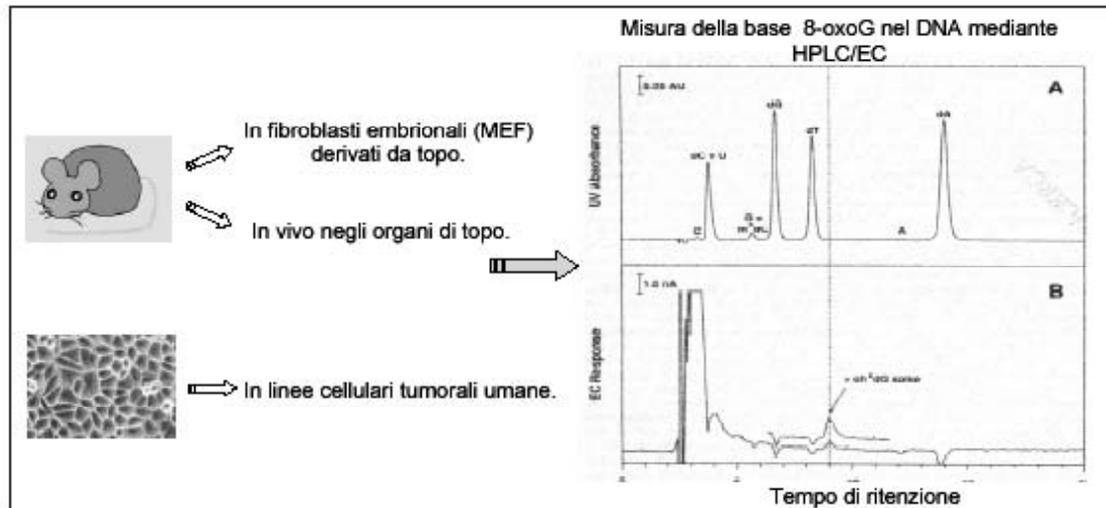


Figura 2. Misura dell'8-oxoG nel DNA mediante HPLC-EC

I dati presenti in letteratura sull'accumulo di danno ossidativo e formazione di tumori in topi knock-out per i principali enzimi responsabili della rimozione del danno ossidativo (*ogg1*<sup>-/-</sup>, *myh*<sup>-/-</sup>), non forniscono un quadro semplice da analizzare. In particolare è stato riportato che i topi *ogg1*<sup>-/-</sup> sono vitali, mostrano un accumulo di 8-oxoG tessuto-specifico (incrementi di 2 volte nel fegato), un modesto aumento nella frequenza di mutazione e non sviluppano tumori (5,6). Non è quindi chiaro se il coinvolgimento di *Ogg1* nella protezione dai tumori sia semplicemente molto limitato o se altri geni debbano essere inattivati per innescare il processo di tumorigenesi.

Difetti ereditari nel gene *MYH* sono associati nell'uomo con mutazioni somatiche G→T nel gene della poliposi adenomatosa del colon (APC) in tumori coloretali multipli. Non è tuttavia chiaro quale sia il contributo relativo del background genetico e di fattori ambientali nell'insorgenza dei tumori del colon e se il difetto in *MYH* sia associato con la formazione di tumori in altre sedi.

Alla luce di queste informazioni nel nostro laboratorio abbiamo analizzato i livelli di ossidazione spontanea in topi difettivi per la glicosilasi *myh* o per entrambe le glicosilasi *myh* e *ogg1*. I livelli di 8-oxoG sono stati misurati nei seguenti organi: cervello, polmoni, intestino, milza, rene e fegato. Non è stato osservato nessun accumulo di 8-oxoG negli organi di animali wild-type seguiti fino ai 12 mesi di età. L'inattivazione della singola glicosilasi *myh*, come nel caso dell'inattivazione di *ogg1*, causa un accumulo significativo di danno ossidativo in funzione dell'età esclusivamente nel fegato. Nel caso invece che entrambe le glicosilasi siano inattive si osserva un progressivo accumulo di 8-oxoG nel DNA di due organi, polmone e intestino. L'accumulo aumenta con un andamento lineare, inizia intorno ai quattro mesi di età, e, a 16 mesi, è di circa tre volte superiore rispetto ai livelli basali (Figura 3).

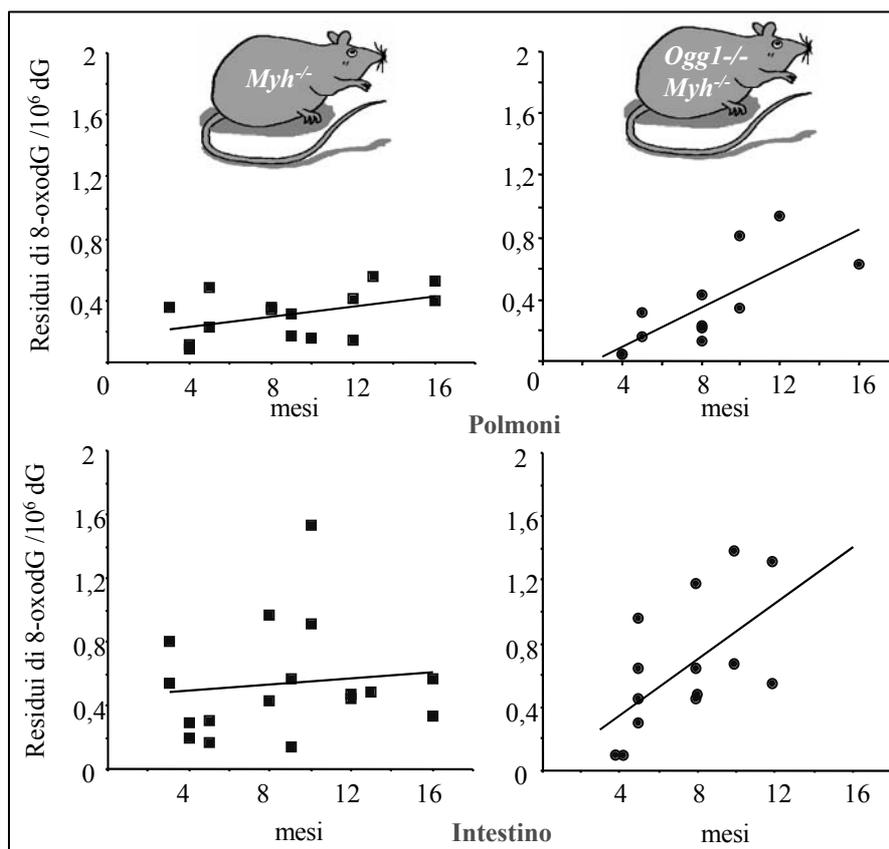


Figura 3. Livelli di 8-oxoG nel DNA del polmone e dell'intestino dei topi *myh*<sup>-/-</sup> e *myh*<sup>-/-</sup>*ogg1*<sup>-/-</sup>

In conclusione, il fegato è l'unico organo in cui l'inattivazione di un solo gene, *ogg1* o *myh*, è associato ad un accumulo età-dipendente di 8-oxoG nel DNA. Questo dato potrebbe essere la conseguenza di un alto metabolismo ossidativo insieme al ruolo di questo organo nella detossificazione degli xenobiotici. I nostri dati quindi forniscono la prima evidenza diretta che l'inattivazione di entrambe le glicosilasi *myh* e *ogg1* è necessaria affinché l'8-oxoG si accumuli in altri organi di topo quali l'intestino e il polmone. Quest'accumulo sinergico di danno ossidativo negli animali difettivi in ambedue i geni è in accordo con il lavoro di cooperazione che queste due glicosilasi svolgono nella rimozione dell'8-oxoG.

Inoltre nei topi *myh*<sup>-/-</sup>*ogg1*<sup>-/-</sup> un altro gruppo di ricercatori ha osservato un aumento dell'incidenza dei tumori nel polmone, nell'intestino e nell'ovaio (7). Il polmone e l'intestino sono gli organi in cui abbiamo individuato un accumulo età-dipendente di 8-oxoG nel DNA. I nostri dati suggeriscono, quindi che l'accumulo di purine ossidate gioca un ruolo causale nello sviluppo del cancro (8).

L'assenza di un significativo accumulo di 8-oxoG nel rene, nella milza e nel cervello suggerisce l'esistenza di altri sistemi di riparazione del DNA che potrebbero essere coinvolti nella rimozione di questo tipo di danno con modalità organo-specifiche. Dati presenti in letteratura suggeriscono ad esempio un ruolo per il Mismatch Repair (MMR) nel processamento di questa lesione. Infatti un difetto parziale nella proteina *msh2* del MMR nei topi *myh*<sup>-/-</sup>*ogg1*<sup>-/-</sup>*msh2*<sup>+/-</sup> è causa di un aumento della progressione tumorale rispetto ai topi *myh*<sup>-/-</sup>*ogg1*<sup>-/-</sup>. Sebbene

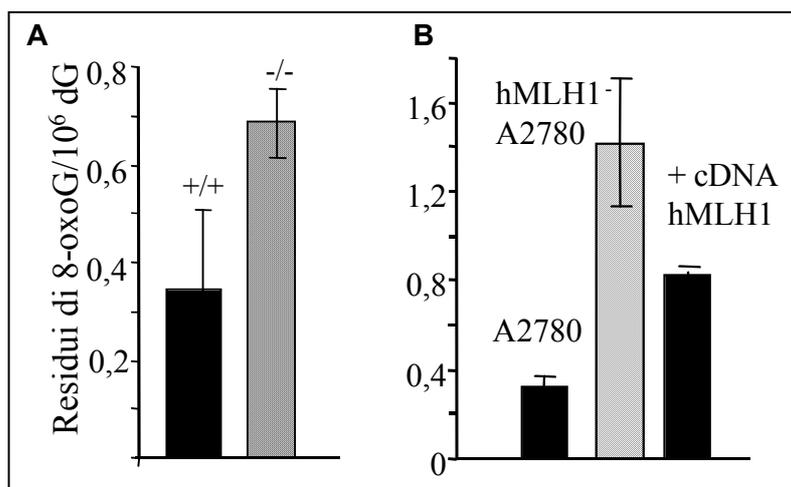
livelli di ossidazione *in vivo* nel DNA di topi difettivi nel MMR non sono noti, questi dati suggeriscono che questo sistema di riparazione agisce in maniera indipendente dai geni del BER nella prevenzione dei tumori associati a danno ossidativo.

## Ruolo del *mismatch repair* nella riparazione del danno ossidativo

Il MMR è un sistema di riparazione del DNA di tipo post-replicativo, che interviene nella rimozione di appaiamenti errati delle basi sfuggiti alla correzione da parte dell'attività esonucleasica 3'→5' delle DNA polimerasi (9). Questo sistema di riparazione gioca un ruolo cruciale nel controllare l'integrità del genoma in tutti gli organismi, dai batteri all'uomo, sia correggendo i *mismatch*, sia eliminando eventuali anse extra-elica più o meno estese che rappresentano i precursori delle mutazioni *frameshift*, sia impedendo la ricombinazione tra sequenze omologhe ma non identiche di DNA (10). Il meccanismo di riparazione è *multi-step* e prevede una fase di riconoscimento del substrato, l'eliminazione del filamento contenente l'errore, la risintesi del filamento corretto e una successiva saldatura dei due filamenti. Nelle cellule di mammifero il riconoscimento del *mismatch* avviene ad opera del complesso eterodimerico MutS $\alpha$ , formato da MSH2 e MSH6, il cui legame al *mismatch* è stabilizzato dalla presenza dall'eterodimero di MLH1 e PMS2 (complesso MutL $\alpha$ ). Gli altri fattori coinvolti nel MMR sono l'esonucleasi 1, FEN1, la DNA polimerasi  $\delta$ , PCNA (antigene nucleare della proliferazione cellulare) e RFC (fattore di replicazione C). L'assenza di questo sistema riparativo si riflette in un aumento del tasso di mutazione spontanea (fenotipo mutatore), incluso un aumento nelle mutazioni "frameshift" con conseguente instabilità di sequenze ripetute come i microsatelliti (*MicroSatellite Instability*, MSI). Inoltre i topi knockout per i geni del MMR mostrano un' aumentata suscettibilità ai tumori e muoiono a circa sei mesi di vita a causa di linfomi e tumori del tratto gastrointestinale.

Nel nostro laboratorio sono state ottenute diverse evidenze sperimentali che suggeriscono un coinvolgimento del MMR nel processamento del danno ossidativo (11). In particolare sono stati paragonati i livelli di ossidazione spontanea in cellule murine e umane wild-type o difettive per il MMR. Il modello murino è costituito da fibroblasti embrionali di topo (MEF) derivati da topi *msh2*<sup>-/-</sup> o *msh2*<sup>+/+</sup>. La misura dei livelli basali di 8-oxoG nel DNA indica che MEF *msh2*<sup>-/-</sup> vanno incontro ad un aumento significativo della base ossidata rispetto a cellule *msh2*<sup>+/+</sup> (Figura 4A).

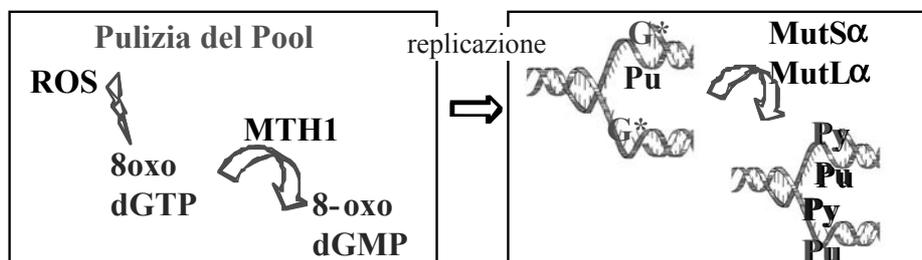
Dal momento che quest'effetto poteva essere confinato unicamente a difetti nella proteina *msh2* e non ad altre proteine del MMR, i livelli d'ossidazione sono stati analizzati in una linea tumorale umana difettiva per il gene *hMLH1*. Il modello cellulare è costituito in questo caso dalla linea tumorale derivata da un carcinoma ovarico (A2780), e da un clone da essa derivato che è risultato difettivo nel gene *hMLH1* in seguito a ipermetilazione del suo promotore. Nel DNA del clone MMR difettivo è stato osservato un accumulo di 8-oxoG circa quattro volte superiore rispetto a quello della linea parentale. Inoltre l'introduzione del cDNA del gene *hMLH1* nel clone MMR difettivo, ricostituendo almeno parzialmente l'attività riparativa, era in grado di ridurre i livelli di danno ossidativo nel DNA (Figura 4B).



**Figura 4. Livelli basali di 8-oxoG nel DNA di cellule con difetti nel MMR**

I livelli d’ossidazione che si osservano in un sistema cellulare difettivo per il MMR sono confrontabili a quelli osservati in analoghi sistemi difettivi per le glicosilasi del BER. Questo risultato indica quindi che il MMR fornisce una protezione significativa dall’accumulo di purine ossidate nel DNA.

Dal momento che il MMR è un meccanismo di riparazione post-replicativo, abbiamo ipotizzato che questo possa avere un ruolo nella rimozione delle basi ossidate provenienti dal pool dei nucleotidi ossidati (Figura 5).



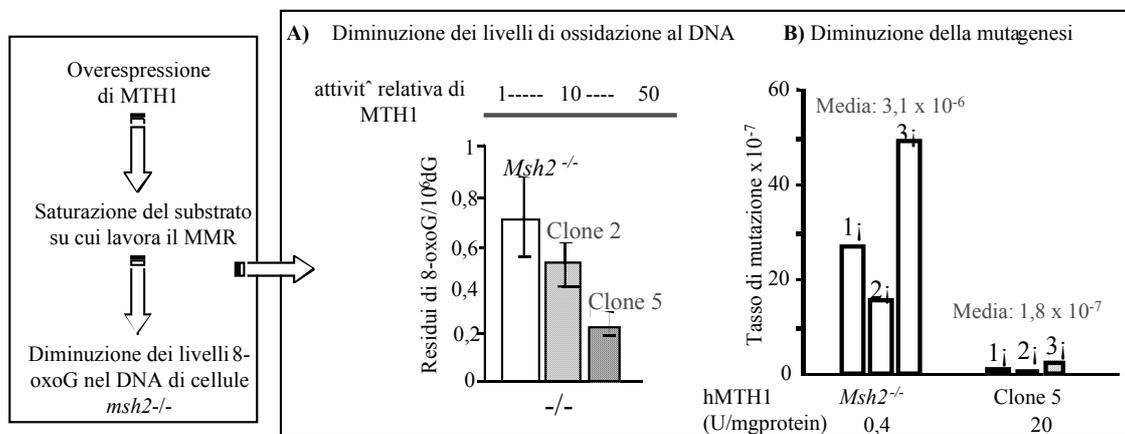
**Figura 5. Meccanismo d’azione dell’idrolasi hMTH1 e del MMR nella rimozione del danno ossidativo**

Al fine di chiarire il meccanismo d’azione del MMR nella rimozione del danno ossidativo, è stata scelta la seguente strategia sperimentale: abbiamo trasfettato l’idrolasi umana MTH1 in cellule MMR difettive al fine di ridurre fortemente il substrato su cui agisce il MMR. Sono stati quindi analizzati gli effetti dell’aumentata espressione di MTH1 a due livelli, la presenza dell’8-oxoG nel DNA e il tasso di mutazione spontaneo (Figura 6).

La presenza di hMTH1 determina una forte riduzione dei livelli d’ossidazione spontanea nelle cellule *msh2*<sup>-/-</sup>. In particolare, sono stati misurati i livelli di 8-oxoG nelle cellule *msh2*<sup>-/-</sup> e in due cloni indipendenti (clone 2 e clone 5) derivati da cellule *msh2*<sup>-/-</sup> trasfettate con MTH1 e che esprimono la proteina MTH1 a differenti livelli. In concomitanza con una maggiore quantità

della proteina MTH1, si osserva una riduzione di 8-oxoG nel DNA. Questo dato suggerisce che il *pool* dei dNTPs costituisce una fonte rilevante di danno ossidativo e in particolare di 8-oxoG. Inoltre la diminuzione dei livelli di 8-oxoG nelle MEFs *msh2*<sup>-/-</sup> a livelli paragonabili a quelli delle cellule wild-type (dati non mostrati) avvalorava l'ipotesi che il MMR sia responsabile dell'escissione della 8-oxoGMP incorporata dal *pool* dei nucleotidi agendo sul DNA di nuova sintesi.

Per studiare gli effetti di una aumentata espressione di hMTH1 sulla mutagenesi spontanea, abbiamo analizzato il tasso di mutazione spontanea nel gene *hprt* nelle cellule *msh2*<sup>-/-</sup> e nel clone 5 che sovraesprime l'idrolasi hMTH1. Il tasso di mutazione spontanea nel gene *hprt* nelle cellule *msh2*<sup>-/-</sup>, valutato in tre diversi esperimenti, è di  $3,1 \pm 0,32 \times 10^{-6}$  per cellula per generazione. Questo valore è molto elevato, in accordo con il fenotipo mutatore di cellule MMR difettive, e risulta 25 volte più alto rispetto ad un tasso di mutazione di cellule *wild-type* di topo (12). Nel clone 5, in cui il livello di espressione di hMTH1 è particolarmente aumentato (50 volte di incremento), si osserva una riduzione di 17 volte del tasso di mutazione spontanea che raggiunge il valore di  $1,8 \pm 0,36 \times 10^{-7}$  (Figura 6).



**Figura 6. Schema della strategia sperimentale allestita per chiarire il ruolo del MMR nella rimozione del danno ossidativo**

In conclusione, questi dati indicano una correlazione quantitativa tra i livelli di espressione di hMTH1 e la diminuzione del fenotipo mutatore di cellule *msh2*<sup>-/-</sup>. Infatti un aumento di espressione di circa 50 volte della proteina hMTH1 è in grado di diminuire drasticamente il fenotipo mutatore associato con il difetto in *msh2*. I dati ottenuti quindi avvalorano fortemente l'ipotesi di un coinvolgimento del MMR nella rimozione del danno ossidativo derivato dal *pool* dei nucleotidi (13).

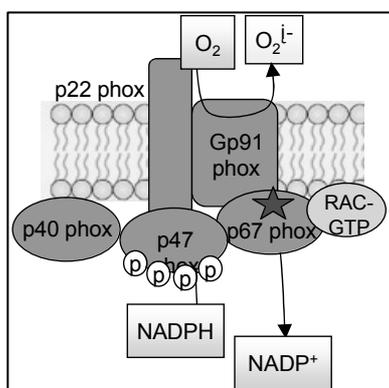
## Effetto di una iperproduzione di ROS endogeni in un *background* MMR-difettivo

Tra i ROS prodotti dal metabolismo cellulare, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, un intermedio di numerose reazioni, è fortemente reattiva e la sua mancata rimozione determina un accumulo di danno che può essere letale per la cellula. Dati pubblicati recentemente dimostrano che il fenotipo mutatore associato

a difetti nel MMR, dipende in gran parte dalla presenza di purine ossidate (13); l'incorporazione della 8-oxoG in sequenze ripetute di uno o più nucleotidi durante il processo replicativo potrebbe portare alla formazione di mutazioni frameshift e quindi determinare MSI. Ci proponiamo di mettere a punto un modello sperimentale in cui verificare questa ipotesi in cui sia quindi possibile studiare gli effetti sulla stabilità del genoma di uno stress ossidativo prolungato.

I ROS sono molecole contenenti uno o più elettroni spaiati nell'orbitale esterno che possono danneggiare tutte le macromolecole cellulari; agiscono infatti sui lipidi, sulle proteine e sugli acidi nucleici, in dipendenza della loro localizzazione, natura e concentrazione. A causa di questa estrema reattività sono considerati come fattori importanti in numerosi processi cellulari e in particolare è stato proposto un loro coinvolgimento nell'infiammazione, apoptosi, senescenza, e cancro. Pertanto nelle cellule si sono evoluti numerosi meccanismi *scavenger* per limitare gli effetti dei ROS. Il primo livello di difesa è rappresentato dall'attività di enzimi ad azione antiossidante quali, superossido dismutasi, catalasi e glutatione perossidasi che catalizzano la riduzione dei ROS ad acqua, come anche da antiossidanti ad azione non enzimatica, come le vitamine C, A ed E. Infine sono presenti i meccanismi descritti nei paragrafi precedenti e deputati al riconoscimento e alla riparazione del danno indotto sul DNA e sui nucleotidi (BER, MMR, e la famiglia delle idrolasi).

È importante sottolineare che i ROS svolgono un loro normale ruolo fisiologico quali mediatori e promotori di importanti eventi cellulari. Infatti si è osservato che una somministrazione di basse dosi di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> stimola la proliferazione cellulare di fibroblasti, cellule muscolari e cellule endoteliali (14). Inoltre nei fagociti è stato identificato e caratterizzato un complesso multiproteico responsabile della produzione di ROS a scopo di *host defence*. Tale complesso denominato *NADPH oxidase*, è composto da due subunità transmembrana, p22 e gp91, e da tre subunità citosoliche, p47, p67 e Rac2 (15) appartenenti tutte alla famiglia dei geni *NOX* (Figura 7).



**Figura 7. Complesso dei NADPH ossidasi con le sue subunità e schematizzazione del suo funzionamento**

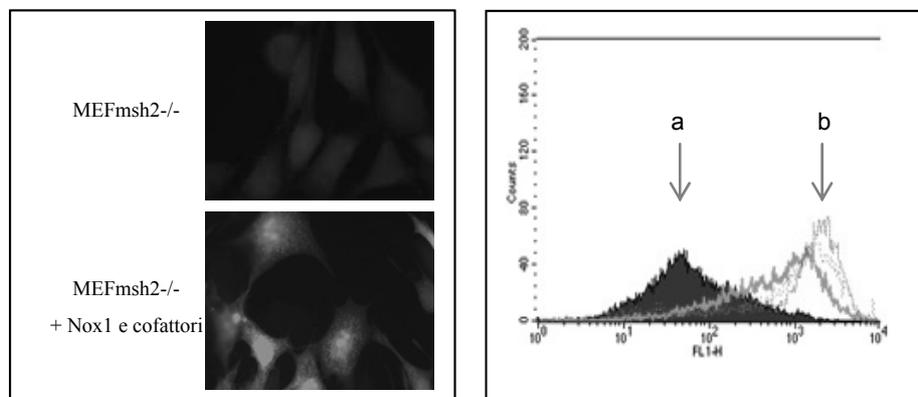
Recenti studi hanno evidenziato la presenza di numerosi omologhi dei geni *NOX* in cellule di mammifero non-fagocitiche (*NOX1*, *NOX3* e *NOX4*, strutturalmente simili a gp91, *NOX5*, *DUOX1* e *DUOX2*). Questi sono espressi principalmente nell'epitelio del colon, nell'utero, nella prostata, nel rene e nel tessuto muscolare liscio (16) e la loro attività si manifesta sia nella cellula embrionale che in quella adulta. Tali evidenze hanno permesso di ipotizzare che i geni *NOX* non siano responsabili esclusivamente della produzione di ROS a scopo di *host defence*

ma che siano coinvolti in diversi meccanismi cellulari, quali ad esempio la trasduzione del segnale, la crescita cellulare, differenziamento e apoptosi (17).

*NOX1*, omologo di gp91 è espresso nelle cellule epiteliali del colon e la sua espressione è modulata durante il differenziamento. È inoltre interessante sottolineare come in cellule immortalizzate che overesprimono *NOX1*, elevati livelli di ROS si accompagnano ad un'intensa attività metabolica e ad un elevato tasso proliferativo associato alla trasformazione neoplastica (16). Più recentemente è stato dimostrato che il *NOX1* necessita per la sua attività enzimatica della presenza di due cofattori citoplasmatici, *NOXO1* (*NOX organizer*) e *NOXA1* (*NOX activator*). Tali cofattori sono gli analoghi fagocitari di p47 e p67 e l'assenza di uno solo di essi determina la parziale inattivazione dell'attività enzimatica di *NOX1* (18).

Al fine di studiare quale sia la risposta cellulare ad un stress continuato di tipo ossidativo, abbiamo quindi deciso di utilizzare il gene *NOX1* insieme ai suoi co-fattori quale sistema modello per produrre alti livelli di ROS in cellule murine e umane. Un vettore contenente il cDNA di *NOX1*, insieme a due vettori contenenti i cofattori responsabili dell'attivazione di *NOX1*, *NOXO1* e *NOXA1*, è stato quindi trasfettato nei fibroblasti derivati da topi *msh2*<sup>+/+</sup> e *msh2*<sup>-/-</sup> e in linee tumorali umane. Dopo la selezione, la produzione di ROS è stata rivelata tramite l'utilizzo di una sonda fluorescina (CM-H2DCFDA) che reagisce con l' $H_2O_2$  producendo un segnale d'intensità proporzionale alla concentrazione della stessa. La DCFDA, una molecola lipofila, attraversa la membrana cellulare per diffusione passiva, il suo gruppo acetato viene rimosso dalle diesterasi cellulari producendo una molecola carica negativamente e non fluorescente, la DCFH. La reazione con perossido di idrogeno e  $H_2O_2$  produce la 2,7 diclorofluoresceina, che emette un segnale fluorescente a 530 nm con livelli di fluorescenza proporzionale ai ROS prodotti. Le cellule sono state analizzate sia tramite citofluorimetria di flusso che tramite microscopia per verificare l'effettivo aumento di ROS cellulari.

Abbiamo osservato che l'espressione di *NOX1* accoppiata alla simultanea espressione dei suoi cofattori determina un notevole incremento nei livelli di ROS endogeni (Figura 8).



**Figura 8. Aumento di fluorescenza evidenziato tramite microscopia a fluorescenza in cellule *msh2*<sup>-/-</sup> trasfettate con *NOX1*, *NOXO1*, *NOXA1* (sinistra) e incremento dell'intensità di fluorescenza tramite citofluorimetria a flusso (destra). I picchi si riferiscono a cellule di controllo *msh2*<sup>-/-</sup> non trasfettate (a) e a 3 cloni trasfettati con vari cDNA (b)**

L'analisi è stata eseguita sia sul *pool* di cellule trasfettate che nei singoli cloni trasfettati. L'analisi microscopica dei vari cloni non evidenzia forti differenze fenotipiche nei cloni che iperesprimono i geni della famiglia NOX. Sono in corso tuttavia esperimenti nei cloni che

accumulano una maggiore quantità di ROS nucleari per identificare eventuali variazioni nella proliferazione cellulare e/o nella distribuzione nelle varie fasi del ciclo cellulare. Questi dati indicano che è possibile quindi modulare il livello endogeno di ROS attraverso l'espressione di un set di NADPH oxidase in un background MMR-difettivo.

Questa linea cellulare costituisce quindi un buon modello sperimentale per studiare a) se un'elevata e continua produzione di ROS è in grado di aumentare l'instabilità genetica in un background MMR difettivo; b) se i diversi sistemi di riparazione del DNA presenti in una popolazione WT siano in grado, costitutivamente o modulando i livelli di espressione dei vari geni coinvolti, di proteggere la cellula dalla produzione continua di specie ossidanti.

## Bibliografia

1. Dou H, Mitra S, Hazra TK Repair of oxidized bases in DNA bubble structures by human DNA glycosylases NEIL1 and NEIL2. *J Biol Chem* 2003 Dec 12; 278:49679-84.
2. Le Page F, Kwok EE, Avrutskaya A, Gentil A, Leadon SA, Sarasin A, Cooper PK. Transcription-coupled repair of 8-oxoguanine: requirement for XPG, TFIIH, and CSB and implications for Cockayne syndrome. *Cell* 2000 Apr 14;101:159-71
3. Mo J-Y, Maki H, Sekiguchi M. Hydrolytic elimination of a mutagenic nucleotide, 8-oxodGTP, by human 18-kilodalton protein: sanitization of nucleotide pool. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:11021-25.
4. Fujikawa K, Kamiya H, Yakushiji H, Nakabeppu Y, Kasai H, Human MTH protein hydrolyzes the oxidized ribonucleotide, 2-hydroxy-ATP. *Nucleic Acids Res*, 2001; 29:449-54.
5. Osterod M, Hollenbach S, Hengstler JG, Barnes DE, Lindahl T, Epe B Age-related and tissue-specific accumulation of oxidative DNA base damage in 7,8-dihydro-8-oxoguanine-DNA glycosylase (Ogg1) deficient mice. *Carcinogenesis* 2001;22:1459-63.
6. Klungland A, Rosewell I, Hollenbach S, Larsen E, Daly G, Epe B, Seeberg E, Lindahl T, Barnes DE. Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:13300-05.
7. Xie Y, Yang H, Cunanan C, Okamoto K, Shibata D, Pan J, Barnes DE, Lindahl T, McIlhatton M, Fishel R, Miller JH. Deficiencies in mouse Myh and Ogg1 result in tumor predisposition and G to T mutations in codon 12 of the K-ras oncogene in lung tumors. *Cancer Res* 2004;64:3096-02.
8. Russo MT, De Luca G, Degan P, Parlanti E, Dogliotti E, Barnes DE, Lindahl T, Yang H, Miller JH, Bignami M. Accumulation of the oxidative base lesion 8-hydroxyguanine in DNA of tumor-prone mice defective in both the Myh and Ogg1 DNA glycosylases. *Cancer Res* 2004;64:4411-14.
9. Buermeier AB, Deschenes SM, Baker SM, Liskay RM. Mammalian DNA mismatch repair. *Ann Rev Genet* 1999;3:533-64.
10. De Wind N, Dekker M, van Rossum A, van der Valk M, te Riele H Mouse models for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Cancer Res* 1998;248-55.
11. Colussi C, Parlanti E, Degan P, Aquilina G, Barnes D, Macpherson P, Karran P, Crescenzi M, Dogliotti E, Bignami M. The mammalian mismatch repair pathway removes DNA 8-oxodGMP incorporated from the oxidized dNTP pool. *Curr Biol* 2002;12:912-18.
12. Drake JW, Charlesworth B, Charlesworth D, Crow JF. Rates of spontaneous mutation. *Genetics* 1998;148:1667-86.
13. Russo MT, Blasi MF, Chiera F, Fortini P, Degan P, Macpherson P, Furuichi M, Nakabeppu Y, Karran P, Aquilina G, Bignami M. The oxidized deoxynucleoside triphosphate pool is a

- significant contributor to genetic instability in mismatch repair-deficient cells. *Mol Cell Biol* 2004;24:465-74.
14. Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem* 2001;11:173-86.
  15. Geiszt M, Lekstrom K, Witta J, Leto TL. Proteins homologous to p47phox and p67phox support superoxide production by NAD(P)H oxidase 1 in colon epithelial cells. *J Biol Chem* 2003;278:20006-12.
  16. Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, Chung AB, Griendling KK, Lambeth JD. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase. *Mox1 Nature* 1999;401:79-82.
  17. Banfi B, Clark RA, Steger K, Krause KH. Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1. *J Biol Chem* 2003;278:3510-13.
  18. Takeya R, Ueno N, Kami K, Taura M, Kohjima M, Izaki T, Nunoi H, Sumimoto H. Novel Human Homologues of p47 phox and p67 phox Participate in Activation of Superoxide-producing NADPH Oxidases. *J Biol Chem* 2003; 278:25234-46.

# RIPARAZIONE PER ESCISSIONE DI BASI DEL DANNO OSSIDATIVO: MECCANISMI E RILEVANZA BIOLOGICA

Laura Narciso, Eugenia Dogliotti  
Dipartimento Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria

## Introduzione

### Danno ossidativo e DNA

Le specie reattive dell'ossigeno (*reactive oxygen species*, ROS) sono prodotte dal normale metabolismo aerobico e da agenti ambientali (es. radiazioni) e sono fonte di danno per diverse componenti cellulari quali le membrane plasmatiche, proteine, carboidrati e acidi nucleici.

Nel corso dell'evoluzione le cellule hanno sviluppato molteplici strategie per prevenire gli effetti deleteri dell'ossidazione. Una prima linea di difesa consiste nell'impiegare enzimi in grado di disattivare le principali specie reattive presenti all'interno della cellula. I ROS sfuggiti all'azione catalitica degli enzimi antiossidanti provocano danno al DNA quali la formazione di basi ossidate, siti apurinici/apirimidinici (AP) e rotture dei filamenti di DNA.

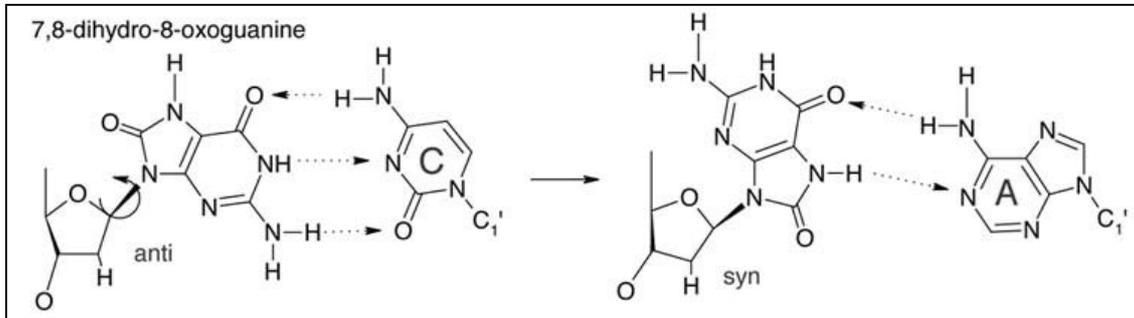
Diversi meccanismi di riparazione sono coinvolti nel controllo dei livelli di ossidazione del DNA, inclusi il *Nucleotide Excision Repair* (NER) e il *Mismatch Repair* (MMR), ma il meccanismo di elezione per la riparazione del danno ossidativo è il *Base Excision Repair* (BER) (per una rassegna vedi 1, 2). Questo processo è caratterizzato da cinque reazioni altamente coordinate: (a) la rimozione della base danneggiata ad opera di DNA glicosilasi specifiche; (b) l'incisione del risultante sito abasico catalizzata da una AP endonucleasi; (c) il processamento dei terminali prodotti; (d) la sintesi dei nucleotide/i mancanti; (e) e infine il ripristino dell'integrità della catena fosfodiesterica del DNA da parte di una DNA ligasi.

Le DNA glicosilasi sono classificate in monofunzionali e bifunzionali. Le prime possiedono esclusivamente un'attività glicosilasica e l'incisione del sito abasico prodotto richiede l'intervento della maggiore 5'-AP endonucleasi eucariotica, APE1. Le DNA glicosilasi bifunzionali rimuovono la base danneggiata e, grazie all'attività AP liasica associata, incidono anche il risultante sito AP in 3'. I terminali prodotti da questi due tipi di DNA glicosilasi dovranno essere ulteriormente processati affinché la riparazione sia completata.

Dopo l'azione glicosilasica e l'incisione del legame fosfodiesterico del DNA, il BER può procedere attraverso due vie alternative, lo *short-patch* BER e il *long-patch* BER, così dette in base alla lunghezza del frammento danneggiato rimosso e poi risintetizzato (per una rassegna vedi 3). Nella prima via di riparazione la DNA polimerasi  $\beta$  (Pol  $\beta$ ) svolge un ruolo principale sia nel processo di sintesi riparativa inserendo il nucleotide mancante che nella rimozione del terminale 5'dRP, creato da APE1. Nel *long-patch* BER un oligonucleotide di 2-7 nucleotidi, che originariamente conteneva la lesione, viene allontanato ed escisso da una *flap*-endonucleasi, FEN1, e nel processo di risintesi la DNA polimerasi  $\beta$  può essere sostituita dalle polimerasi replicative  $\delta/\epsilon$ . Altri enzimi comuni al processo replicativo, quali PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) e RFC (*replication factor C*) sono specificamente richiesti in questa via riparativa.

In questo lavoro descriveremo i meccanismi di riparazione della base ossidata più diffusa e rilevante biologicamente, generata dalla reazione della guanin con i ROS, la 7,8 diidro 8-

oxoguanina (8oxoG). Dati sperimentali hanno mostrato che questa guanina ossidata è una lesione pre-mutagenica in quanto determina appaiamenti erranei con l'adenina durante la replicazione inducendo mutazioni per trasversione G:C → T:A (Figura 1).



**Figura 1. Le due possibili conformazioni assunte dall'8-oxoguanina e appaiamento erraneo con l'adenina**

## Riparazione di 8oxoG/C: ruolo di OGG1

L'enzima OGG1 è una DNA glicosilasi bifunzionale in grado di rimuovere specificamente l'8-oxoG e, mediante una reazione di  $\beta$ -eliminazione, di incidere in 3' rispetto al sito AP prodotto (4). Le due attività di OGG1 non sono associate e l'attività AP liasica è meno efficiente di quella glicosilatica (4-6).

Sono state individuate due isoforme distinte di OGG1:  $\alpha$ -hOGG1 che localizza principalmente nel nucleo e  $\beta$ -hOGG1 che è presente solo nei mitocondri (per una rassegna vedi 7). L'espressione di OGG1 rimane inalterata durante il ciclo cellulare (8, 9) e anche sotto stress ossidativo (10); il suo ruolo funzionale è svolto principalmente durante gli stadi pre-replicativi del ciclo cellulare. OGG1 contiene un motivo *helix-hairpin-helix* (HhH) comune a molte DNA glicosilasi procariotiche ed eucariotiche (11). OGG1 possiede un'alta affinità per i suoi stessi prodotti: i siti AP e i prodotti della  $\beta$ -eliminazione. La sua attività glicosilatica è stimolata di circa cinque volte in presenza di APE1 (12), (13). Il DNA inciso al 3'-OH prodotto da APE1, ha un'affinità di legame molto bassa con OGG1. L'aggiunta di APE1 nella reazione di riparazione facilita il turnover di OGG1 e la rende disponibile per altri eventi di riparazione (12).

Il processamento dei siti AP generati da OGG1 avviene mediante Pol  $\beta$  e gli enzimi dello *short-patch* BER. Nel nostro laboratorio abbiamo ricostituito *in vitro* questa reazione di riparazione (6). Il saggio di riparazione che abbiamo utilizzato (Figura 2) è basato sull'uso di un plasmide costruito *in vitro* con tecniche di replicazione in modo tale che contenga la lesione di interesse in una posizione nota del suo genoma. Il plasmide viene incubato con estratti cellulari o proteine purificate in presenza di nucleotidi marcati radioattivamente. Il plasmide viene digerito con opportuni enzimi di restrizione e mediante elettroforesi su gel denaturante di poliaccrilamide è possibile visualizzare su una lastra autoradiografica i frammenti radioattivi (corrispondenti alla avvenuta riparazione) e valutare l'efficienza e il tipo di via BER (*short-versus long-patch*).

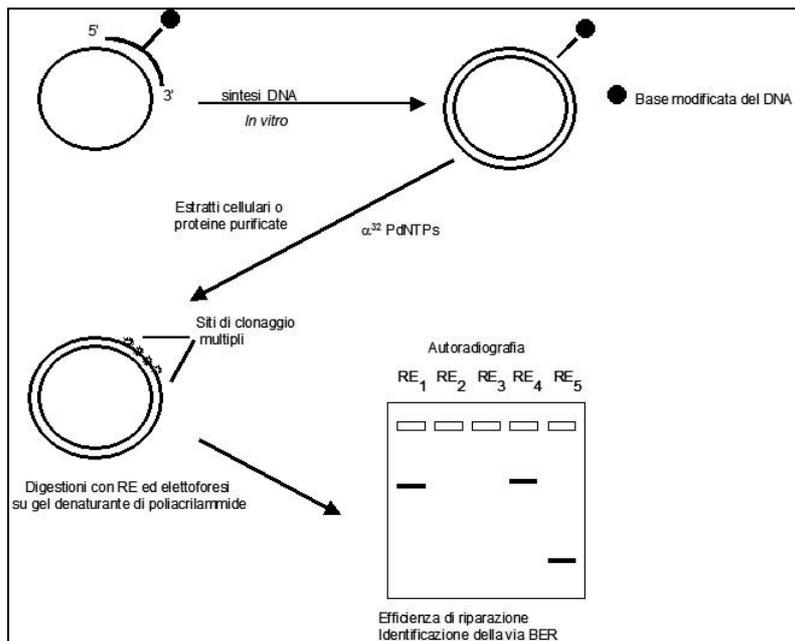


Figura 2. Rappresentazione schematica di un saggio *in vitro* di riparazione BER

Con l'uso di questo saggio abbiamo dimostrato che la riparazione della 8oxoG richiede essenzialmente quattro proteine: OGG1, APE1, Pol  $\beta$  e una DNA ligasi (in questo caso abbiamo utilizzato la DNA ligasi I) (Figura 3, corsia 1). Quando la DNA ligasi era omessa (corsia 2), si osservavano gli intermedi riparativi in cui la base ossidata era stata sostituita da una guanina non modificata radioattiva ma non era ancora avvenuta la reazione di ligazione. In assenza di Pol  $\beta$ , APE1 o OGG1 (corsie 3-5) non si osservava alcun prodotto di riparazione. Un oligonucleotide di 60 nucleotidi marcato (IS) viene aggiunto nelle reazioni di riparazione per controllare il recupero del DNA plasmidico.

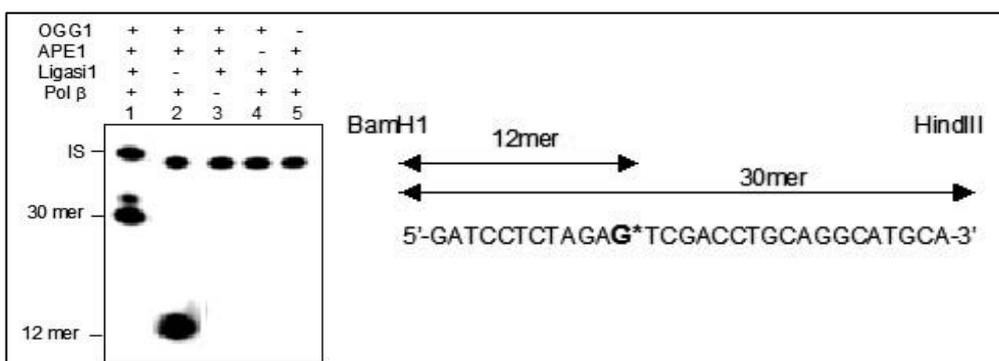


Figura 3. Ricostruzione *in vitro* della riparazione della 8oxoG (G\*) con proteine purificate: autoradiografia di un gel denaturante di poliaccrilamide

In base ai nostri dati e a quanto presente in letteratura, il meccanismo d'azione proposto con cui OGG1 rimuove 8-oxoG è illustrato in Figura 4.

Alla luce degli studi più recenti (14) un ruolo chiave è giocato da XRCC1 che viene reclutato al sito della lesione attraverso l'interazione con la DNA glicosilasi OGG1, APE1 e PARP1. Questi enzimi interagiscono con la stessa regione linker- BRCT1 di XRCC1 suggerendo un assemblaggio e disassemblaggio dinamico degli enzimi del BER. Questo processo garantirebbe la "protezione" degli intermedi reattivi, potenzialmente tossici e mutageni (15) in un meccanismo altamente coordinato di "passaggio della staffetta" (16). È stato inoltre proposto che OGG1 possa agire come una glicosilasi monofunzionale (senza utilizzare la sua attività AP liasica) stimolata nel suo turnover da APE1 che giocherebbe il ruolo di 5' AP endonucleasi (13). Quale sia il meccanismo rilevante *in vivo* non è stato stabilito.

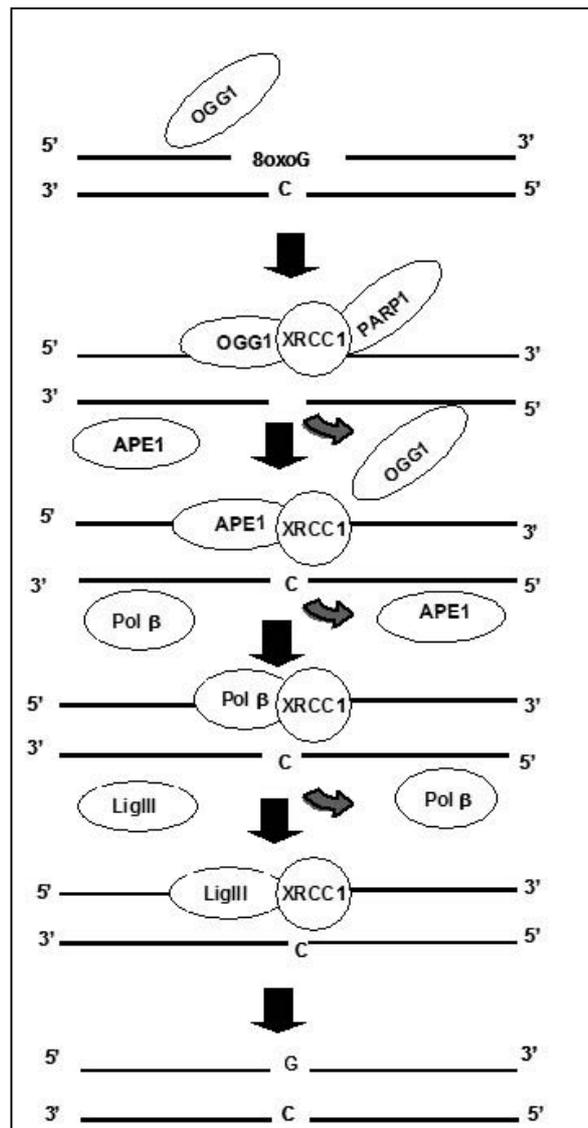


Figura 4. Modello per la riparazione dell'8oxoG.

## Riparazione di 8oxoG/A: ruolo di MYH

Se i *mismatches* 8oxoG/C non vengono riparati prima della replicazione, l'incorporazione di un'adenina di fronte alla guanina ossidata produrrà il substrato per la DNA glicosilasi MYH (omologo umano di Mut Y di *Escherichia coli*) (17), che rimuove l'adenina dagli accoppiamenti: 8-oxoG/A, A/G ed A/C.

Ci sono due forme di questa DNA glicosilasi: una presente nel nucleo e l'altra nei mitocondri (18). L'espressione di questa DNA glicosilasi varia con il ciclo cellulare e raggiunge i massimi livelli nella fase S. MYH colocalizza con il fattore PCNA ai foci di replicazione (19). L'insieme di queste caratteristiche sottolinea il ruolo importante di MYH nel prevenire la fissazione della mutazione, dovuta alla persistenza di 8-oxoG, durante la replicazione cellulare.

Questo enzima possiede anche una bassa attività AP liasica, inferiore di circa dieci volte rispetto a quella glicosilasica (20). MYH interagisce con APE1 (21) e, come nel caso di OGG1, la formazione di questo complesso promuove l'attività adenina-glicosilasica stimolando il *turnover* di MYH.

Un modello che descrive come si succedano le principali fasi della riparazione di 8-oxoG/A è rappresentato in Figura 5.

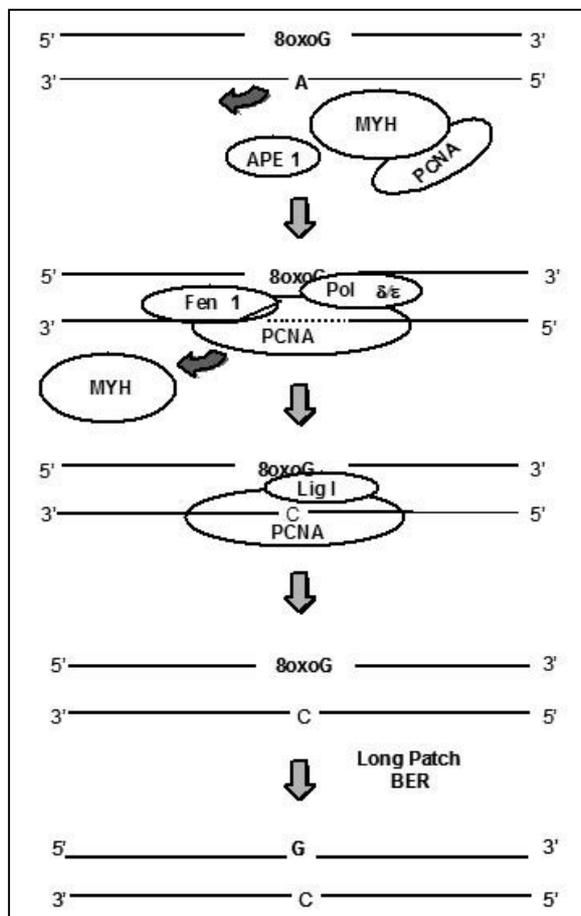
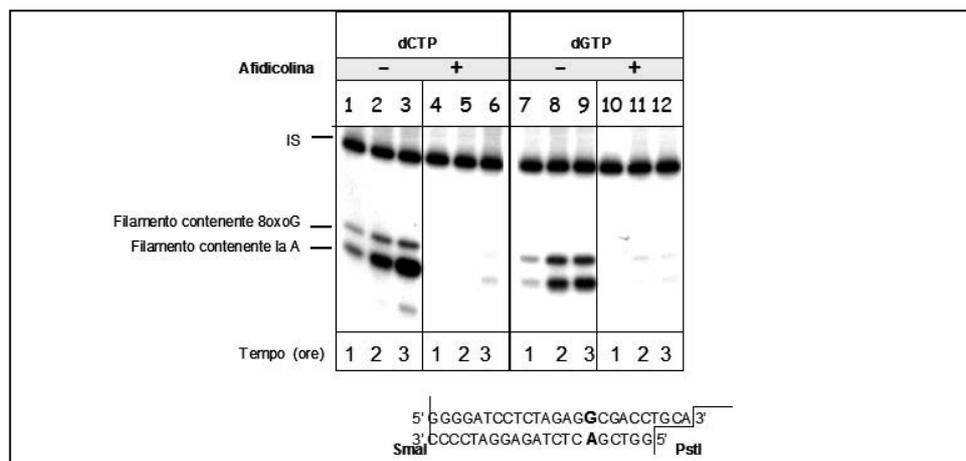


Figura 5. Modello per la riparazione di 8oxoG/A.

Inizialmente MYH rimuove l'adenina opposta all'8-oxoG; la glicosilasi rimane strettamente legata al risultante sito AP finché non interviene APE1 che incide il filamento complementare alla base ossidata. È stata dimostrata un'alta affinità di MYH per l'intermedio 8-oxoG/ sito AP che provoca un basso turnover dell'enzima (21). Anche in questo caso, come per OGG1, tale legame è necessario per "mascherare" e proteggere gli intermedi riparativi potenzialmente citotossici. L'incisione mediata da APE1 avviene solo quando PCNA e altre proteine necessarie alla riparazione sono presenti. La reazione di polimerizzazione è operata dalle DNA polimerasi replicative ( $\delta$  o  $\epsilon$ ) che incorporano preferenzialmente una citosina di fronte alla guanina ossidata ricostituendo il substrato 8-oxoG/C di OGG1 (22). L'identificazione dell'incorporazione della citosina ad opera delle polimerasi replicative è stata effettuata eseguendo un saggio BER *in vitro*, simile a quello descritto in Figura 2. Il plasmide contenente la lesione 8-oxoG/A è stato incubato con estratti cellulari per diversi tempi (Figura 6).



**Figura 6. Cinetica di riparazione di 8oxoG/A mediata da estratti cellulari di HeLa in presenza di afidicolina: autoradiografia di un gel di poliacrilamide denaturante.**

Due eventi di riparazione BER si osservavano con incorporazione preferenziale di dCMP radioattivo nel filamento contenente la A (corsie 1-3) e dGMP radioattivo nel filamento contenente la 8-oxoG (corsie 7-9). Se nella reazione veniva aggiunta afidicolina (corsie 4-6, 10-12), uno specifico inibitore dell'attività catalitica delle DNA polimerasi replicative, entrambe le reazioni di riparazione venivano inibite. Il coinvolgimento di polimerasi replicative e la richiesta di PCNA per la reazione di riparazione suggeriscono che il *long-patch* BER sia coinvolto nella riparazione dei mismatches 8-oxoG/A e 8-oxoG/C generati dall'inserimento della C di fronte alla guanina ossidata. Questi dati suggeriscono un modello (Fig. 5) in cui i *mismatches* 8-oxoG/C, che in fase prereplicativa sono riparati prevalentemente via *short-patch* BER, se formati dopo l'intervento di MYH alla forca di replicazione, potrebbero scegliere come via preferenziale di riparazione il *long-patch* BER che condivide con il processo replicativo molti *partners* enzimatici (*replication associated repair*, RAR).

## NEIL1 e NEIL2 e riparazione del danno ossidativo nel ciclo cellulare

NEIL1 e NEIL2 sono le DNA glicosilasi specifiche per basi ossidate più recentemente identificate (23, 24). Condividono con OGG1 la capacità di riconoscere l'8oxoG ma preferenzialmente, ed esclusivamente nel caso di NEIL2, quando è localizzata in strutture di DNA definite "bolle" tipiche della replicazione e/o trascrizione (25). Possiedono una intrinseca attività AP liasica che genera, mediante una reazione di  $\beta/\delta$  eliminazione, un terminale 3'-fosfato a partire dal sito AP. L'espressione di NEIL1 aumenta notevolmente durante la fase S del ciclo cellulare. Recentemente è stata dimostrata una stimolazione dell'attività glicosilasica di OGG1 da parte di NEIL1 (26) analoga a quella esercitata da APE1. Infatti NEIL1 promuove il turnover di OGG1 e successivamente taglia il sito AP, prodotto da OGG1 stessa, generando un *terminale* 3'P. Diversamente da NEIL1, l'espressione di NEIL2 non varia durante il ciclo cellulare; il suo ruolo potrebbe essere confinato alla riparazione dei geni attivamente trascritti (TCR, riparazione associata alla trascrizione) (25).

L'esistenza di molteplici glicosilasi che possiedono la medesima specificità di substrato indica l'importanza per la cellula di eliminare le basi ossidate. Molti studi suggeriscono che la ridondanza di questi enzimi riparativi possa indicare un differenziamento funzionale con l'intervento di diversi sistemi riparativi dipendentemente dallo stato della cellula (fase del ciclo cellulare, stato trascrizionale, differenziamento, ecc.) (per una rassegna vedi 27). Per quanto riguarda il danno ossidativo possiamo ipotizzare il seguente scenario. In uno stadio post-mitotico, le cellule quiescenti che non subiscono ulteriori divisioni cellulari, utilizzano prevalentemente il NER e il BER come meccanismi di riparazione del DNA. Nelle cellule proliferanti, dove avviene una continua replicazione cellulare, il NER è usato esclusivamente per il DNA stampo, mentre il MMR per il filamento nascente. Il processo BER è richiesto per entrambi i filamenti anche se la riparazione del filamento parentale dovrebbe essere predominante. Un più elevato livello di ossidazione è infatti atteso su questo filamento a causa della presenza di enzimi del MMR, come MTH che, idrolizzando 8oxodGTP dal pool dei nucleotidi ad 8oxodGMP, ne prevengono l'incorporazione nel filamento nascente di DNA.

Un particolare meccanismo di riparazione, indipendente dalla fase del ciclo cellulare, è il TCR. Tutte le cellule infatti, sia post-mitotiche che in attiva replicazione, mantengono la trascrizione per assicurare le funzioni cellulari e per la sopravvivenza. È stato ipotizzato un meccanismo di riparazione associato alla trascrizione per 8oxoG in cui OGG1 servirebbe per riparare il filamento non trascritto mentre quello trascritto sarebbe riparato da proteine del NER come XPG, TFIIH e CSB (28, 29).

## Riparazione del danno ossidativi in cellule di mammifero

Le cellule di mammifero, difettive negli enzimi del BER, sono state usate come modello per lo studio dei meccanismi di riparazione del danno ossidativo. Sobol e collaboratori (30) hanno sviluppato un sistema cellulare difettivo nello *short-patch* BER, in particolare linee di fibroblasti murini difettive nel gene che codifica per Pol  $\beta$ . Il nostro laboratorio (31, 32) e altri gruppi (33) hanno dimostrato che queste cellule utilizzano esclusivamente la via *long-patch* BER per riparare siti abasici e basi modificate. Queste linee cellulari sono ipersensibili agli

effetti citotossici degli agenti alchilanti (come il metil metansulfonato, MMS) (30) e degli agenti ossidanti (come il perossido di idrogeno, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (32). Inoltre, saggi di riparazione *in vitro* basati sull'uso di plasmidi contenenti un singolo residuo di 8oxoG (8oxoG/C), hanno evidenziato che gli estratti delle cellule *Pol β*<sup>-/-</sup> riparano questa base ossidata meno efficientemente delle cellule in cui *Pol β* è funzionale (34).

Mediante esperimenti di *Comet assay* è stata analizzata la riparazione delle rotture a singolo filamento (SSB) indotte da MMS e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (32). Nel caso del MMS abbiamo osservato un rallentamento nella riparazione delle SSB in assenza di *Pol β* indicando che questa polimerasi ha un ruolo chiave nella riparazione delle purine alchilate che procede preferenzialmente via *short-patch* BER (30-33). Non abbiamo osservato invece nessuna differenza nella riparazione delle SSB indotte da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tra cellule difettive per *Pol β*, e cellule non difettive. Questi dati suggeriscono che un meccanismo di riparazione alternativo allo *short-patch* BER, mediato da polimerasi diverse da *Pol β* è in grado di riparare le lesioni ossidative indotte da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Il *long-patch* BER è un possibile candidato per la riparazione di queste lesioni.

Il ruolo importante che il *long-patch* BER svolge nella riparazione del danno ossidativo è anche suggerito dall'ipersensibilità all'effetto citotossico della H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> delle cellule di pollo difettive per FEN1 (35). FEN1 è una endonucleasi struttura-specifica coinvolta nella replicazione ma che ha anche un ruolo cruciale nella riparazione via *long-patch* BER perché taglia alla base della struttura *flap* costituita dal frammento contenente il 5'dRp. Queste cellule sono ipersensibili agli agenti ossidanti ma non agli alchilanti, confermando che le due vie BER possano avere una specificità di intervento dipendente dal tipo di lesione (34).

Dati recenti hanno evidenziato il coinvolgimento di enzimi del BER, quali XRCC1 e *Pol β*, in fasi differenti del ciclo cellulare (36) suggerendo che i diversi meccanismi BER, *short-* e *long-patch*, si possano anche differenziare funzionalmente. Noi abbiamo recentemente dimostrato (37) che le SSB indotte da MMS sono riparate meno efficientemente in cellule difettive in *Pol β* sincronizzate in G1, che in cellule *wild-type*, confermando che *Pol β* agisce principalmente in fase pre-replicativa. Non abbiamo invece osservato alcuna differenza nella capacità di riparazione quando le cellule difettive o non per *Pol β* erano trattate in fase S. La riparazione delle SSB in fase S non richiede pertanto *Pol β*, ma probabilmente il *long-patch* BER. XRCC1 è invece una componente essenziale per la riparazione delle SSB in tutte le fasi del ciclo cellulare (36) e questo giustifica il fenotipo maggiormente sensibile delle cellule *XRCC1*<sup>-/-</sup> rispetto a quelle difettive in *Pol β* (Tabella 1).

**Tabella 1. Caratteristiche di linee cellulari murine difettive per XRCC1 e Pol β\***

FENOTIPO	XRCC1 <sup>-/-</sup>	Pol β <sup>-/-</sup>
Sensibilità a MMS	Molto elevata	Elevata
Sensibilità a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Elevata	Elevata**
Sensibilità a radiazioni ionizzanti	Leggermente aumentata	Nessuna differenza
Riparazione di rotture a singolo filamento	Ridotta dopo radiazioni ionizzanti e agenti alchilanti	Ridotta dopo MMS
Riparazione di rotture a doppio filamento	Ridotta dopo raggi X	Ridotta dopo MMS
Scambi tra cromatidi fratelli	Aumento dei livelli spontanei e indotti	Aumento dei livelli indotti
Aberrazioni cromosomiche	Aumento dei livelli spontanei e indotti	Aumento dei livelli indotti
Frequenza di mutazione	Aumento della frequenza spontanea e indotta	Aumento della frequenza indotta

\* tabella modificata da (37)

\*\* l'ipersensibilità a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> non si osserva in linee *Pol β*<sup>-/-</sup> a passaggi precoci (33)

## Difetti del BER nelle patologie umane

L'eccessiva presenza di ROS nelle cellule è stata associata con diverse patologie come le infiammazioni croniche, tipiche delle malattie autoimmuni, le malattie neurodegenerative e il cancro. Gli eventi che portano alla trasformazione neoplastica possono essere le mutazioni del DNA, l'attivazione di proto-oncogeni e l'inattivazione o la perdita di geni soppressori tumorali; tutti questi processi avvengono in condizioni di stress ossidativo (38). Inoltre un maggior rischio di cancro è stato associato con difetti nella riparazione del danno ossidativo del DNA (39, 40).

Il fenotipo di topi difettivi in alcuni geni del BER è riassunto nella Tabella 2. Anche se l'inattivazione della maggior parte delle DNA glicosilasi è ben tollerata, topi *knockout* per OGG1 sviluppano cancro al polmone intorno ai 18 mesi.

**Tabella 2. Conseguenze di difetti in geni del BER in modelli murini e associazione con vari tipi di patologie umane**

Enzima	Attività	Fenotipo topo-/-	Potenziale coinvolgimento in malattie umane	Variazioni genetiche associate alle
NTH1 OGG1	Glicosilasi Glicosilasi	Vitali Vitali, cancro ai polmoni dopo 18 mesi	Vari tipi di tumore Cancro del rene e del polmone Cancro del polmone	Polimorfismi Mutazioni geniche Ridotta attività enzimatica
MYH	Glicosilasi	Vitali	Adenomi e carcinomi coloretali multipli	Mutazioni geniche
NEIL1	Glicosilasi	ND	Cancro gastrico	Mutazioni geniche**
APE1	AP- endonucleasi	Letali embrionali	Cancro della prostata, seno e ovario, colite ulcerosa	Variazione nella espressione della proteina
FEN1 Pol $\beta$ Pol $\delta$	Flap endonucleasi I dRP liasi e DNA polimerasi DNA polimerasi	Letali embrionali Letali embrionali Perdita dell'attività esonucleasica 3'-5' e aumentato rischio di cancro	Vari tipi di tumore	Varianti dello <i>splicing</i>
DNA ligasi I DNA ligasi III XRCC1	DNA ligasi DNA ligasi Fattore accessorio per ligasi	Letali embrionali ND Letali embrionali	Vari tipi di tumore	Polimorfismi

\* le voci bibliografiche specifiche sono contenute in (53)

\*\*riferimento bibliografico (54)

Difetti negli enzimi che intervengono nel BER in fasi successive alla rimozione della base modificata sono letali per i topi. L'assenza di APE1, Pol  $\beta$  e XRCC1 tuttavia può essere letale nei topi anche per un ruolo diverso da quello giocato nel BER da parte di questi enzimi. Dati recenti ottenuti con esperimenti di siRNA in cellule eucariotiche dimostrerebbero che il ruolo svolto da APE1 nella riparazione dei siti AP è determinante per la letalità cellulare e per l'induzione dell'apoptosi (41).

Polimorfismi in diversi enzimi del BER sono stati descritti e un'ampia varietà di studi, purtroppo spesso contrastanti, ha invocato un'associazione tra alcune varianti polimorfiche e più elevato rischio di cancro (per una rassegna vedi 42). Un'alta frequenza di varianti di *splicing* del gene Pol  $\beta$  sono state descritte in diversi tipi di tumore in diverse sedi quali colon, polmone, cervello, seno e vescica (43-46). Dati recenti del nostro laboratorio (Simonelli e Dogliotti, dati non pubblicati) mostrano anche un'alta frequenza di varianti di *splicing* nel tumore gastrico. Queste varianti sono tuttavia presenti anche nei tessuti gastrici normali. Il loro ruolo come potenziale regolatore dei livelli cellulari di Pol  $\beta$  è attualmente oggetto di studio. Va ricordato che un'aumentata espressione di Pol  $\beta$  è stata associata con l'induzione di instabilità genomica (47). Recentemente, sono state descritte mutazioni ereditarie nel gene MYH in pazienti affetti da carcinomi e adenomi multipli coloretali (47-49). Studi funzionali hanno messo in evidenza una diminuita attività glicosilasica delle varianti identificate (48, 51).

Crescente attenzione è stata ultimamente rivolta al ruolo giocato da alterazioni nell'espressione di enzimi del BER nell'insorgenza di patologie. Harris e collaboratori (52) hanno dimostrato che pazienti affetti da colite ulcerosa, caratterizzata da infiammazione cronica e over-produzione di ROS, hanno una maggiore espressione e attività degli enzimi APE1 ed AAG (DNA glicosilasi specifica per le basi metilate) nei tessuti interessati all'infiammazione. Questo fenomeno era associato con la presenza di instabilità dei microsatelliti (MSI) nei tessuti esaminati.

Questi e altri dati suggeriscono che un generale disequilibrio degli enzimi coinvolti nel BER possa essere un nuovo meccanismo per l'induzione di instabilità genomica. È importante che la ricerca futura sul ruolo del BER nelle malattie umane includa l'analisi dei livelli di espressione dei geni del BER e studi meccanicistici per capirne il ruolo nell'eziopatogenesi di malattie da instabilità genomica.

## Bibliografia

1. Boiteux S, Radicella JP. Base excision repair of 8-hydroxyguanine protects DNA from endogenous oxidative stress. *Biochimie* 1999;81:59-67.
2. Gros L, Saparbaev M, Laval J. Enzymology of the repair of free radicals-induced DNA damage. *Oncogene* 2002;21:8905-25.
3. Dogliotti E, Fortini P, Pascucci B, Parlanti E. Multiple *pathways* for DNA base excision repair. The mechanism of switching among multiple BER *pathways*. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2001;68:1-28.
4. Bjoras M, Luna L, Johnsen B, Hoff E, Haug T, Rognes T, *et al.* Opposite base-dependent reactions of a human base excision repair enzyme on DNA containing 7,8-dihydro-8-oxoguanine and abasic sites. *EMBO J* 1997;16:6314-22.
5. Zharkov DO, Rosenquist TA, Gerchman SE, Grollman AP. Substrate specificity and reaction mechanism of murine 8-oxoguanine-DNA glycosylase. *J Biol Chem* 2000;275:28607-17.
6. Pascucci B, Maga G, Hubscher U, Bjoras M, Seeberg E, Hickson ID, *et al.* Reconstitution of the base excision repair *pathway* for 7,8-dihydro-8-oxoguanine with purified human proteins. *Nucl Acids Res* 2002;30:2124-30.
7. Boiteux S, Radicella JP. The human OGG1 gene: structure, functions, and its implication in the process of carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys* 2000;377:1-8.
8. Dhenaut A, Boiteux S, Radicella JP. Characterization of the hOGG1 promoter and its expression during the cell cycle. *Mutat Res* 2000;461:109-18.

9. Bouziane M MF, Bates SE, Somsouk L, Sang BC, Denissenko M, O'Connor TR. Promoter structure and cell cycle dependent expression of the human methylpurine-DNA glycosylase gene. *Mutat Res* 2000;461:15-29.
10. Saitoh T, Shinmura K, Yamaguchi S, Tani M, Seki S, Murakami H, *et al.* Enhancement of OGG1 protein AP lyase activity by increase of APEX protein. *Mutat Res* 2001;486:31-40.
11. Thayer MM, Ahern H, Xing D, Cunningham RP, Tainer JA. Novel DNA binding motifs in the DNA repair enzyme endonuclease III crystal structure. *EMBO J* 1995;14:4108-20.
12. Hill JW, Hazra TK, Izumi T, Mitra S. Stimulation of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase by AP-endonuclease: potential coordination of the initial steps in base excision repair. *Nucl Acids Res* 2001;29:430-38.
13. Vidal AE, Hickson ID, Boiteux S, Radicella JP. Mechanism of stimulation of the DNA glycosylase activity of hOGG1 by the major human AP endonuclease: bypass of the AP lyase activity step. *Nucleic Acids Res* 2001;29:1285-92.
14. Campalans A, Marsin S, Nakabeppu Y, O'Connor T R, Boiteux S, Radicella JP. XRCC1 interactions with multiple DNA glycosylases: a model for its recruitment to base excision repair. *DNA Repair (Amst)* 2005;4:826-35.
15. Simonelli V, Narciso L, Dogliotti E, Fortini P. Base excision repair intermediates are mutagenic in mammalian cells. *Nucleic Acid Res* 2005;33:4404-11.
16. Wilson SH, Kunkel TA. Passing the baton in base excision repair [news]. *Nat Struct Biol* 2000;7:176-78.
17. Slupska MM, Baikalov C, Luther WM, Chiang JH, Wei YF, Miller JH. Cloning and sequencing a human homolog (hMYH) of the Escherichia coli mutY gene whose function is required for the repair of oxidative DNA damage. *J Bacteriol* 1996;178:3885-92.
18. Ohtsubo T, Nishioka K, Imaiso Y, Iwai S, Shimokawa H, Oda H, *et al.* Identification of human MutY homolog (hMYH) as a repair enzyme for 2-hydroxyadenine in DNA and detection of multiple forms of hMYH located in nuclei and mitochondria. *Nucl Acids Res* 2000;28:1355-64.
19. Boldogh I, Milligan D, Lee MS, Bassett H, Lloyd RS, McCullough AK. hMYH cell cycle-dependent expression, subcellular localization and association with replication foci: evidence suggesting replication-coupled repair of adenine:8-oxoguanine mispairs. *Nucl Acids Res* 2001;29:2802-09.
20. Williams SD, David SS. Evidence that MutY is a monofunctional glycosylase capable of forming a covalent Schiff base intermediate with substrate DNA. *Nucl Acids Res* 1998;26:5123-33.
21. Yang H, Clendenin WM, Wong D, Demple B, Slupska MM, Chiang JH, *et al.* Enhanced activity of adenine-DNA glycosylase (Myh) by apurinic/apyrimidinic endonuclease (Ape1) in mammalian base excision repair of an A/GO mismatch. *Nucl Acids Res* 2001;29:743-52.
22. Parlanti E, Fortini P, Macpherson P, Laval J, Dogliotti E. Base excision repair of adenine/8-oxoguanine mispairs by an aphidicolin-sensitive DNA polymerase in human cell extracts. *Oncogene* 2002;21:5204-12.
23. Hazra TK, Izumi T, Boldogh I, Imhoff B, Kow YW, Jaruga P, *et al.* Identification and characterization of a human DNA glycosylase for repair of modified bases in oxidatively damaged DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:3523-28.
24. Hazra TK, Kow YW, Hatahet Z, Imhoff B, Boldogh I, Mokkalapati SK, *et al.* Identification and characterization of a novel human DNA glycosylase for repair of cytosine-derived lesions. *J Biol Chem* 2002;277:30417-20.
25. Dou H, Mitra S, Hazra TK. Repair of oxidized bases in DNA bubble structures by human DNA glycosylases NEIL1 and NEIL2. *J Biol Chem* 2003;278:49679-84.

26. Mokkapati SK, Wiederhold L, Hazra TK, Mitra S. Stimulation of DNA glycosylase activity of OGG1 by NEIL1: functional collaboration between two human DNA glycosylases. *Biochemistry* 2004;43:11596-04.
27. Mitra S, Izumi T, Boldogh I, Bhakat KK, Hill JW, Hazra TK. Choreography of oxidative damage repair in mammalian genomes. *Free Radic Biol Med* 2002;33:15-28.
28. Le Page F, Kwok EE, Avrutskaya A, Gentil A, Leadon SA, Sarasin A, *et al.* Transcription-coupled repair of 8-oxoguanine: requirement for XPG, TFIIH, and CSB and implications for Cockayne syndrome. *Cell* 2000;101:159-71.
29. Le Page F, Klungland A, Barnes D, Sarasin A, Boiteux S. Transcription coupled repair of 8-oxoguanine in murine cells: the ogg1 protein is required for repair in nontranscribed sequences but not in transcribed sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:8397-02.
30. Sobol RW, Horton JK, Kuhn R, Gu H, Singhal RK, Prasad R, *et al.* Requirement of mammalian DNA polymerase beta in base excision repair. *Nature* 1996;379:183-86.
31. Fortini P, Pascucci B, Parlanti E, Sobol RW, Wilson SH, Dogliotti E. Different DNA polymerases are involved in the short- and long-patch base excision repair in mammalian cells. *Biochemistry* 1998;37:3575-80.
32. Fortini P, Pascucci B, Belisario F, Dogliotti E. DNA polymerase beta is required for efficient DNA strand break repair induced by methyl methanesulfonate but not by hydrogen peroxide. *Nucl Acids Res* 2000;28:3040-46.
33. Horton JK, Baker A, Berg BJ, Sobol RW, Wilson SH. Involvement of DNA polymerase beta in protection against the cytotoxicity of oxidative DNA damage. *DNA Repair* 2002;1:317-33.
34. Fortini P, Parlanti E, Sidorkina OM, Laval J, Dogliotti E. The type of DNA glycosylase determines the base excision repair pathway in mammalian cells. *J Biol Chem* 1999;274:15230-36.
35. Matsuzaki Y, Adachi N, Koyama H. Vertebrate cells lacking FEN-1 endonuclease are viable but hypersensitive to methylating agents and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Nucl Acids Res* 2002;30:3273-77.
36. Taylor RM, Moore DJ, Whitehouse J, Johnson P, Caldecott KW. A cell cycle-specific requirement for the XRCC1 BRCTII domain during mammalian DNA strand break repair. *Mol Cell Biol* 2000;20:735-40.
37. Pascucci B, Russo MT, Crescenzi M, Bignami M, Dogliotti E. The accumulation of MMS-induced single strand breaks in G1 phase is recombinogenic in DNA polymerase beta defective mammalian cells. *Nucl Acids Res* 2005;33:280-88.
38. Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat Res* 2004;567:1-61.
39. Paz-Elizur T, Krupsky M, Blumenstein S, Elinger D, Schechtman E, Livneh Z. DNA repair activity for oxidative damage and risk of lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003;95(17):1312-19.
40. Gackowski D, Speina E, Zielinska M, Kowalewski J, Rozalski R, Siomek A, *et al.* Products of oxidative DNA damage and repair as possible biomarkers of susceptibility to lung cancer. *Cancer Res* 2003;63:4899-02.
41. Fung H, Demple B. A vital role for Ape1/Ref1 protein in repairing spontaneous DNA damage in human cells. *Mol Cell* 2005;17:463-70.
42. Berwick M, Vineis P. Markers of DNA repair and susceptibility to cancer in humans: an epidemiologic review. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:874-97.
43. Nowak R, Bieganski P, Konopinski R, Siedlecki JA. Alternative splicing of DNA polymerase beta mRNA is not tumor-specific. *Int J Cancer* 1996;68:199-02.
44. Chyan YJ, Strauss PR, Wood TG, Wilson SH. Identification of novel mRNA isoforms for human DNA polymerase beta. *DNA Cell Biol* 1996;15:653-59.

45. Bhattacharyya N, Chen HC, Comhair S, Erzurum SC, Banerjee S. Variant forms of DNA polymerase beta in primary lung carcinomas. *DNA Cell Biol* 1999;18:549-54.
46. Thompson TE, Rogan PK, Risinger JI, Taylor JA. Splice variants but not mutations of DNA polymerase beta are common in bladder cancer. *Cancer Res* 2002;62:3251-56.
47. Yamada NA, Farber RA. Induction of a low level of microsatellite instability by overexpression of DNA polymerase Beta. *Cancer Res* 2002;62:6061-64.
48. Al-Tassan N, Chmiel NH, Maynard J, Fleming N, Livingston AL, Williams GT, *et al.* Inherited variants of MYH associated with somatic G:C-->T:A mutations in colorectal tumors. *Nat Genet* 2002;30:227-32.
49. Jones S, Emmerson P, Maynard J, Best JM, Jordan S, Williams GT, *et al.* Biallelic germline mutations in MYH predispose to multiple colorectal adenoma and somatic G:C-->T:A mutations. *Hum Mol Genet* 2002;11:2961-67.
50. Sieber OM, Lipton L, Crabtree M, Heinimann K, Fidalgo P, Phillips RK, *et al.* Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH. *N Engl J Med* 2003;348:791-99.
51. Chmiel NH, Livingston AL, David SS. Insight into the Functional Consequences of Inherited Variants of the hMYH Adenine Glycosylase Associated with Colorectal Cancer: Complementation Assays with hMYH Variants and Pre-steady-state Kinetics of the Corresponding Mutated E.coli Enzymes. *J Mol Biol* 2003;327:431-43.
52. Hofseth LJ, Khan MA, Ambrose M, Nikolayeva O, Xu-Welliver M, Kartalou M, *et al.* The adaptive imbalance in base excision-repair enzymes generates microsatellite instability in chronic inflammation. *J Clin Invest* 2003;112:1887-94.
53. Fortini P, Pascucci B, Parlanti E, D'Errico M, Simonelli V, Dogliotti E. The base excision repair: mechanisms and its relevance for cancer susceptibility. *Biochimie* 2003;85:1053-71.
54. Shinmura K, Tao H, Goto M, Igarashi H, Taniguchi T, Maekawa M, *et al.* Inactivating mutations of the human base excision repair gene NEIL1 in gastric cancer. *Carcinogenesis* 2004;25:2311-17.

# PRODUZIONE E RIPARAZIONE DI DOPPIE ROTTURE SUL DNA CELLULARE DOPO ESPOSIZIONE A RADIAZIONI IONIZZANTI

Maria Antonella Tabocchini (a, b), Francesca Antonelli (a), Mauro Belli (a, b), Valentina Dini (a, b), Giuseppe Esposito (a, b), Orazio Sapora (b, c), Giustina Simone (a, b), Eugenio Sorrentino (a, b)  
(a) Dipartimento di Tecnologie e Salute  
(b) INFN-Sezione di Roma 1, Gruppo collegato Sanità, Roma  
(c) Dipartimento Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria

## Introduzione

Tra i diversi tipi di danno al DNA, la rottura della doppia elica (DSB, *Double Strand Break*) è considerata la lesione più importante dal punto di vista degli effetti genotossici. DSB possono essere prodotte dall'esposizione a radiazioni ionizzanti e a composti radiomimetici così come da radicali liberi prodotti dal metabolismo ossidativo cellulare, da endonucleasi specifiche durante i processi di riparazione di singole rotture (SSB, *single strand break*) o di danni alle basi (BD, *base damage*), durante la ricombinazione meiotica e durante il riarrangiamento dei geni delle immunoglobuline (VDJ *recombination*). DSB possono anche prodursi quando complessi Topoisomerasi-DNA interferiscono con le forche replicative.

## Induzione di DSB da parte di radiazioni ionizzanti

Le radiazioni ionizzanti producono un ampio spettro di danni al DNA. Modificazioni chimiche come deaminazione, deidrossilazione, rottura di legami base-zucchero, ossidazione dello zucchero o rilascio di gruppi fosfato, sono tutte reazioni che portano a cambiamenti strutturali significativi a livello delle basi e dello zucchero. È necessario inoltre distinguere SSB, DSB e *cross-links* DNA-DNA e DNA-proteine. Tra tutti, le DSB rappresentano il danno più grave per la cellula essendo il più difficile da riparare.

DSB possono essere prodotte sia a seguito di deposizione diretta di energia sulla molecola di DNA, con conseguente rottura di un legame covalente e produzione di radicali altamente reattivi, sia indirettamente mediante attacco di radicali liberi, in particolare quelli derivanti dalla radiolisi dell'acqua, prodotti in vicinanza della molecola *target* (1).

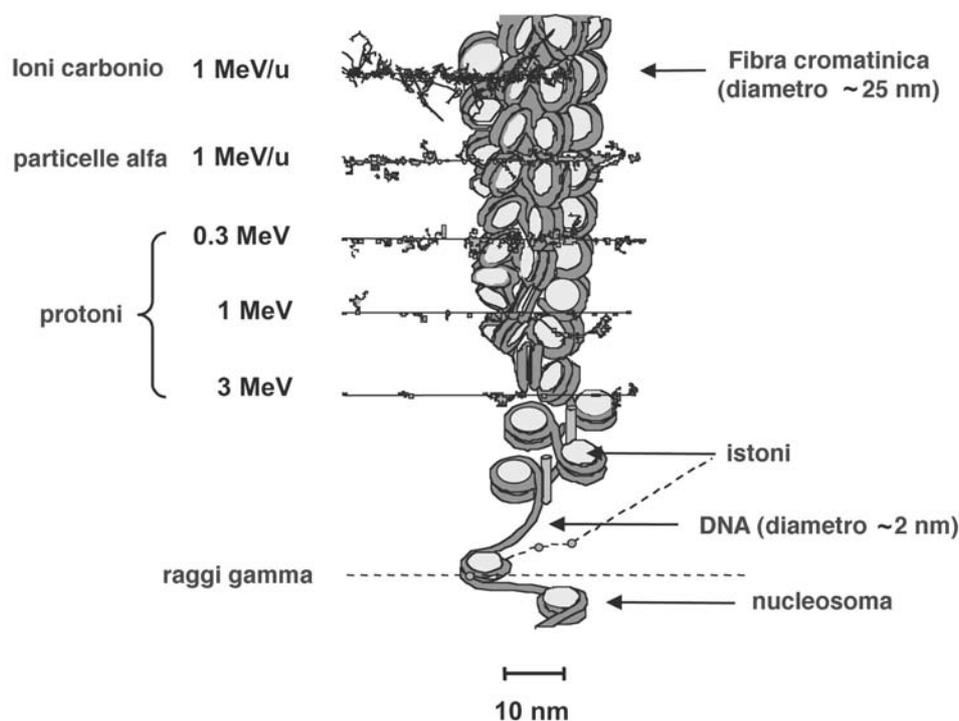
L'importanza relativa dei diversi meccanismi di produzione delle DSB, così come la loro distribuzione spaziale, dipende fortemente dalla qualità della radiazione. Radiazioni densamente ionizzanti, quali ad esempio particelle alfa, producono *cluster* di ionizzazioni con efficienza relativamente alta lungo una traccia ben definita. Questo fa sì che la concentrazione di radicali acquosi prodotti è così alta che i processi di ricombinazione sono favoriti rispetto a quelli di formazione. Di conseguenza, nella produzione di DSB, l'effetto diretto è prevalente. Nel caso di radiazioni sparsamente ionizzanti, quali raggi X o gamma, il contributo dei radicali acquosi è invece più rilevante (Tabella I).

**Tabella 1. Resa radiochimica G\* per le principali specie che si formano nella radiolisi dell'acqua**

RADIAZIONE	e <sup>-</sup> <sub>aq</sub>	°OH	H°	H <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Raggi gamma	2,63	2,72	0,55	0,45	0,68
Particelle alfa	0,42	0,54	0,27	1,11	1,08

\* Numero di specie molecolari che si formano durante la radiolisi dell'acqua a seguito di 100 eV di energia assorbita. La concentrazione prodotta da una dose di 1 Gy è pari a  $G \times 10^{-6}$  mol / L

Considerando le caratteristiche della struttura della traccia in relazione alla struttura del *target* biologico rappresentato dalla cromatina, con i suoi diversi livelli di organizzazione, ci si aspetta che radiazioni densamente ionizzanti diano luogo a lesioni correlate sia su scala locale, dell'ordine dei nanometri (lesioni complesse), che su distanze maggiori. Con radiazioni sparsamente ionizzanti questi effetti di correlazione spaziale non sono altrettanto significativi e lesioni complesse vengono prodotte con minore frequenza, solo in corrispondenza della fine del percorso degli elettroni secondari. A titolo esemplificativo, la Figura 1 confronta, in scala, le tracce di diversi tipi di radiazione con la fibra cromatinica, i nucleosomi e il DNA.



**Figura 1. Rappresentazione schematica delle tracce di radiazioni sparsamente e densamente ionizzanti confrontate con la fibra cromatinica, i nucleosomi e la doppia elica del DNA**

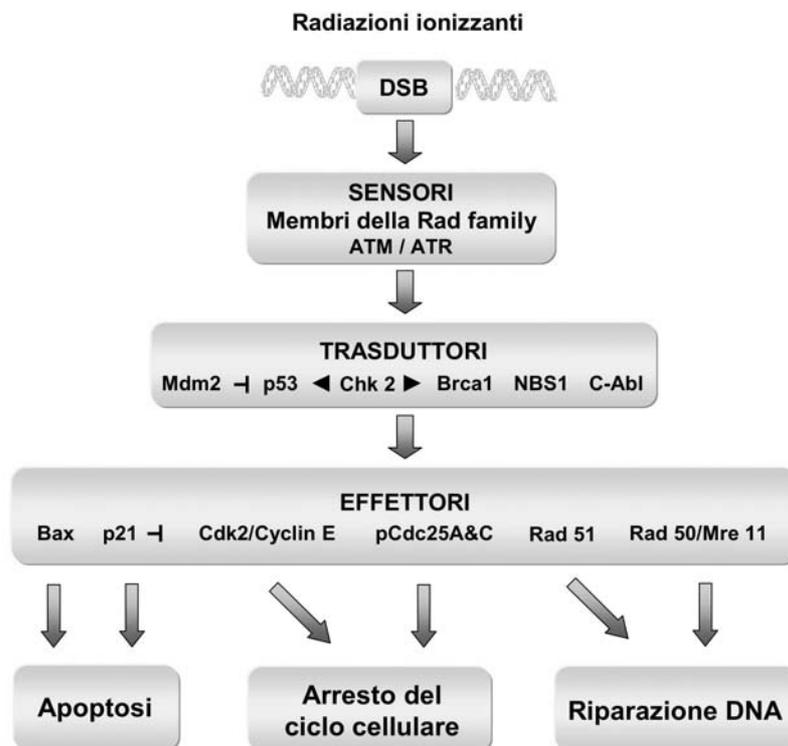
## Risposta cellulare al danno radioindotto

A seguito della produzione di una DSB, segnali a cascata mediati da sensori, trasduttori ed effettori attivano distinti tipi di vie metaboliche provocando, in particolare, l'arresto del ciclo

cellulare e la riparazione enzimatica della lesione. Entrambe queste vie contribuiscono al mantenimento dell'omeostasi cellulare.

## Arresto del ciclo cellulare

Il danno al DNA innesta dei segnali biochimici che attivano *checkpoint* responsabili del ritardo nella progressione del ciclo cellulare, consentendo ai sistemi riparativi più tempo per esercitare la loro azione. In particolare, *checkpoint* in fase G1/S ed S prevengono la replicazione del DNA danneggiato e quelli in fase G2/M prevengono la segregazione di cromosomi danneggiati. Se il danno al DNA non può essere riparato, lo scopo dei *checkpoint* è quello di indurre un arresto permanente del ciclo cellulare o di innescare meccanismi di morte in cellule severamente danneggiate. I componenti di questa complessa catena di segnali, trasmessi essenzialmente attraverso reazioni di fosforilazione, sono stati classificati come sensori del danno, trasduttori ed effettori (Figura 2).



**Figura 2. Rappresentazione schematica della cascata di segnali attivati dalla presenza di una DSB**

Molti di loro sono stati identificati, altri sono stati proposti come possibili candidati (per una trattazione più dettagliata si vedano i riferimenti 2-4).

I sensori sono quelle proteine che, per prime, individuano la presenza di un danno nella cromatina e inviano segnali biochimici che modulano le funzioni di altre proteine. Tra questi si possono citare il complesso Rad1/Rad9/Hus1 e Rad27. Anche ATM è stata individuata come una delle prime proteine che si attivano nel *pathway* di segnalazione.

A valle dei sensori, la trasmissione dei segnali è effettuata di trasduttori, quali ad esempio Chk2, p53, Brca1, Nbs1, C-Abl. La proteina p53 attiva geni come p21, che è un inibitore dei complessi che contengono Cdk e che sono essenziali per l'entrata in fase S, inducendo quindi l'arresto in G1. È stata inoltre identificata un'altra via che porta all'arresto in G1, e che è più rapida e indipendente da p53. Questa via agisce attraverso la degradazione di Cdc25A e provoca una inibizione persistente di Cdk2 che porta al blocco in G1/S (4).

Il controllo del *checkpoint* in G2/M è effettuato via ATM-Chk2, attraverso la fosforilazione di Cdc25C. La forma inattiva di questa proteina, legata alla proteina 14-3-3, non è in grado di esercitare la sua azione fosfatase su Cdc2, prevenendo l'entrata in fase M. Inoltre, un meccanismo dipendente da p53 agisce attraverso la repressione di Cdc2 e del promotore della *cyc-B*. Benché i trasduttori possano essere condivisi da differenti *pathways*, è possibile che effettori specifici siano coinvolti nel blocco in G1/S, S o G2/M.

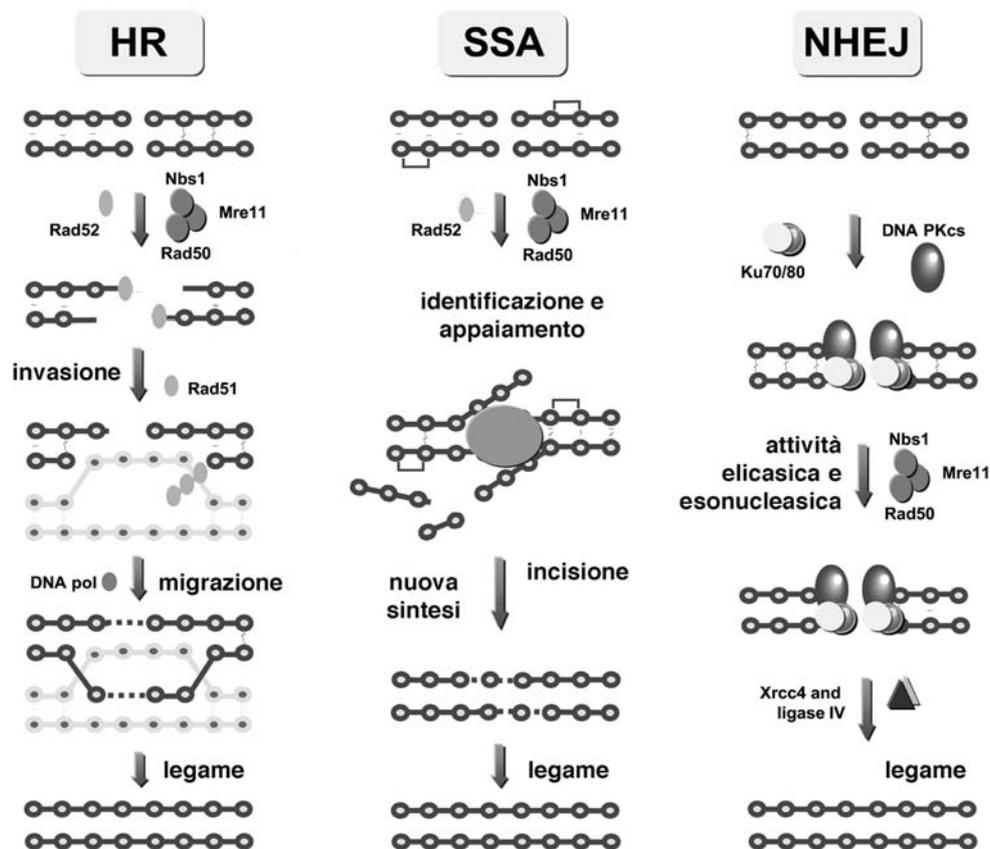
Vi sono evidenze di un legame tra l'arresto del ciclo cellulare e i processi di riparazione del danno così come con i processi apoptotici, considerati anche essi un meccanismo utile per eliminare cellule severamente danneggiate (5).

## Riparazione delle DSB

I principali tipi di riparazione delle DSB sono la ricombinazione omologa (*homologous recombination*, HR) e la riparazione non omologa (*non homologous end-joining*, NHEJ). Un terzo tipo, il *single strand annealing* (SSA), può essere considerato un sotto insieme della HR (6-8).

La differenza fondamentale tra questi diversi tipi di riparazione è il requisito di omologia. Infatti, l'HR richiede la presenza di un filamento di DNA omologo non danneggiato (appaiamento di cromatidi fratelli o cromosomi omologhi) mentre il SSA richiede omologia di sequenza (riassociazione di sequenze complementari poste su filamenti opposti in prossimità della DSB). Al contrario, il NHEJ non richiede omologia di sequenza poiché prevede la ricongiunzione diretta delle estremità libere del DNA. Come conseguenza, l'accuratezza della riparazione costituisce la differenza cruciale tra questi *pathways*: l'HR assicura una riparazione essenzialmente accurata mentre il SSA e il NHEJ prevedono l'incisione del DNA in prossimità della DSB in modo tale che vi è quasi sempre perdita di materiale genetico. In particolare, il SSA prevede sempre la perdita di una delle sequenze ripetute e del frammento di DNA compreso tra le sequenze.

In Figura 3 sono schematizzati i diversi *pathways* di riparazione. Sia nell'HR che nel SSA, sono inizialmente coinvolte proteine della famiglia Rad, mentre nell'NHEJ è l'eterodimero Ku70/Ku80 il primo ad intervenire. Nel NHEJ un ruolo centrale è giocato dalla proteina chinasi DNA-dipendente, la DNA-PK, che consiste nell'eterodimero Ku associato ad una componente che contiene un dominio catalitico chinasi, chiamata DNA-PKcs (*catalytic subunit*) (9). Quest'ultima è un membro del gruppo delle fosfatidilinositolo 3-chinasi (*phosphatidylinositol 3-kinase related kinases*, PIKK), che include anche ATM ed ATR (10). L'interazione dell'eterodimero Ku con la DNA-PKcs innesca l'attività chinasi e facilita il reclutamento e l'attivazione di altre componenti del NHEJ. Il passo finale di ricongiungimento è effettuato dall'eterodimero ligasi IV/Xrcc4 (11).



**Figura 3. Passi principali dei sistemi di riparazione delle DSB in cellule di mammifero. HR: Homologous Recombination; SSA: Single Strand Annealing; NHEJ: Non-Homologous End-Joining**

Vi sono indicazioni che alcune proteine possano partecipare in più di uno dei diversi *pathways* di riparazione. Ad esempio, il complesso Rad50/Mre11/Nbs1, che presenta attività elicastica ed endonucleasica, è coinvolto sia nell'HR che nel NHEJ, in particolare quando è richiesto il processamento delle catene di DNA prima del loro ricongiungimento.

In cellule di mammifero l'importanza relativa dei diversi processi dipende dalla fase del ciclo cellulare (e, in organismi multicellulari, dal tipo cellulare e dallo stadio di sviluppo). L'HR può giocare un ruolo prominente durante la meiosi e quando sono presenti cromatidi fratelli, cioè durante la tarda fase S e la fase G2 del ciclo cellulare, mentre il NHJ è più importante durante la fase G1 e all'inizio della fase S.

## Ruolo dell'istone H2AX nella riparazione delle DSB

Mentre si conosce molto sul ricongiungimento delle DSB, poco si sa sul come queste lesioni vengono riconosciute e su come avviene l'iniziale reclutamento dei fattori di riparo. Un ruolo dell'istone H2AX in questi processi è stato suggerito per la prima volta da Rogakou *et al.* (12). Questi ricercatori hanno messo in evidenza che una delle risposte cellulari più precoci dopo

L'induzione di una DSB è la fosforilazione della serina 139 dell'istone H2AX, una variante minore dell'istone H2A, in corrispondenza del sito di danno. Questo processo avviene in risposta ad una DSB originata sia da esposizione a radiazioni ionizzanti che a seguito di processi enzimatici di rimozione di altre lesioni, collisione di forche replicative, apoptosi, disfunzioni telomeriche (per una *review* vedere 13). La fosforilazione, che inizia entro pochi secondi dall'induzione della doppia rottura, interessa circa 2000 molecole dell'istone H2AX distribuite in prossimità della lesione, per un'estensione di circa 2 Mbp di cromatina (14).

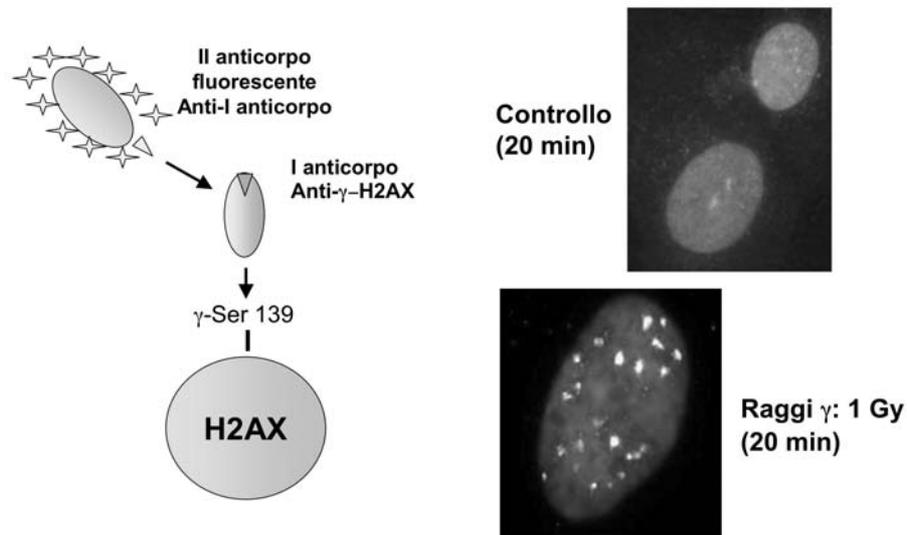
Studi di colocalizzazione proteica hanno mostrato che la fosforilazione dell'istone H2AX è necessaria per il reclutamento di proteine coinvolte nella riparazione del danno e nel blocco del ciclo cellulare (15-17). Recenti esperimenti effettuati su cellule H2AX<sup>-/-</sup> hanno però indicato che il reclutamento di tali proteine può avvenire anche indipendentemente dalla presenza di H2AX. È stato quindi proposto un modello a due stadi secondo il quale l'istone H2AX fosforilato ( $\gamma$ -H2AX) modulerebbe l'accumulo e il mantenimento in situ delle proteine coinvolte nella riparazione e nel *signaling* in regioni della cromatina distali rispetto alla DSB, mentre la loro iniziale migrazione in corrispondenza della lesione sarebbe invece H2AX-indipendente. Tale accumulo potrebbe essere dovuto sia ad una interazione diretta tra specifici domini proteici che derivare dall'alterazione della struttura della cromatina provocata dalla presenza di  $\gamma$ -H2AX nelle regioni che circondano la DSB (18). La presenza di  $\gamma$ -H2AX potrebbe inoltre favorire la riparazione fedele delle DSB prevenendo la prematura separazione delle estremità rotte di DNA, a salvaguardia della cellula nei confronti di riarrangiamenti cromosomici potenzialmente tumorogenici.

Esistono diverse ipotesi su quale/i sia/siano la/e chinasi responsabile/i della fosforilazione dell'istone H2AX. Ad oggi si ritiene che sia ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated protein*) la proteina maggiormente implicata in tale processo (19), anche se recentemente è stato ipotizzato un ruolo importante anche per ATR e DNA-PKcs (20).

## **La valutazione delle DSB radioindotte attraverso lo studio delle cinetiche di fosforilazione-defosforilazione dell'istone H2AX**

La presenza della rapida fosforilazione di H2AX a seguito della formazione di una DSB ha fornito le basi per la messa a punto di un metodo per l'analisi di questo tipo di danno in cellule irradiate con dosi relativamente basse ( $\leq 1$ Gy) di radiazioni ionizzanti. Mediante impiego di anticorpi fluorescenti specifici per l'istone  $\gamma$ -H2AX è infatti possibile individuare single DSB mediante l'osservazione di foci discreti di fluorescenza. La metodica prevede che dopo irradiazione le cellule vengano incubate a 37 °C per permettere ai sistemi cellulari di avviare tutti i processi di risposta all'induzione del danno. Dopo diversi tempi di incubazione le cellule vengono fissate, permeabilizzate e trattate con un anticorpo che ha un'affinità specifica per l'istone  $\gamma$ -H2AX. Un secondo anticorpo fluorescente, specifico per il primo, permette la visualizzazione dei foci mediante microscopia a fluorescenza o confocale (Figura 4).

L'interesse principale per questa tecnica di analisi è dovuto alla sua elevata sensibilità: rendendo possibile l'individuazione anche di una sola DSB all'interno di un nucleo cellulare, rappresenta uno strumento attualmente unico per lo studio dell'induzione delle DSB e della loro riparazione. I principali metodi finora utilizzati per l'analisi delle DSB radioindotte quali la centrifugazione su gradienti di densità, l'eluizione neutra, l'elettroforesi in campo costante e pulsato (che si basano sulla misura del peso molecolare o della lunghezza dei frammenti di DNA prodotti a seguito dell'induzione di DSB) hanno infatti tutti una sensibilità inferiore, e richiedono dosi dell'ordine delle decine di Gy.



**Figura 4. Schema della tecnica di analisi della fosforilazione dell'istone H2AX**

Lo studio delle cinetiche di fosforilazione-defosforilazione dell'istone H2AX ha messo in evidenza un aumento iniziale del numero di foci per cellula che, per diverse linee di fibroblasti umani, raggiunge metà del suo valore massimo entro 3-5 minuti e il valore massimo a 20-30 minuti dall'irradiazione (14). Successivamente, si osserva un declino nel numero di foci poiché, mano a mano che le DSB vengono riparate, le fosfatasi 1 e 2A della cellula rimuovono il gruppo fosfato dall'istone  $\gamma$ -H2AX (21). Esperimenti effettuati utilizzando  $^{125}\text{I}$ , hanno evidenziato una correlazione diretta tra il numero di foci  $\gamma$ -H2AX per cellula e il numero di decadimenti dello  $^{125}\text{I}$  per cellula. Poiché ogni decadimento dello  $^{125}\text{I}$  produce una DSB, si può affermare che ognuna di queste corrisponde ad un focus  $\gamma$ -H2AX (22). In linea di principio è quindi possibile stabilire il numero di doppie rotture radioindotte per cellula andando a contare il numero di foci relativo al picco massimo.

Questa tecnica è stata applicata nel nostro laboratorio per lo studio dell'induzione e della persistenza di DSB indotte da diversi tipi di radiazione e per la determinazione delle relazioni tra presenza del gruppo fosfato sull'istone H2AX e ricongiungimento delle DSB (23).

## **Ruolo delle fosfatasi nella cinetica di fosforilazione dell'istone H2AX**

Esperimenti preliminari, effettuati irradiando con 1 Gy di raggi gamma fibroblasti umani in coltura, hanno riguardato la valutazione di una eventuale defosforilazione istonica durante i primi 20-30 minuti di incubazione post-irradiazione. Se tale contributo non fosse trascurabile, il numero di foci in corrispondenza del picco di fosforilazione potrebbe rappresentare una sottostima del numero iniziale di DSB. L'approccio seguito è stato l'impiego di un inibitore delle fosfatasi 1 e 2A, la caliculina A, che è stato aggiunto al terreno di coltura durante il periodo di incubazione post-irradiazione. In tal modo è stato possibile "marcare" permanentemente ogni DSB, impedendo la defosforilazione dell'istone  $\gamma$ -H2AX.

Da tali esperimenti l'azione delle fosfatasi durante i primi 20-30 minuti di incubazione post-irradiazione è risultata trascurabile (Figura 5) a conferma che il numero di foci in corrispondenza del picco massimo di fosforilazione rappresenta, con buona approssimazione, il numero iniziale di DSB indotte da raggi gamma.

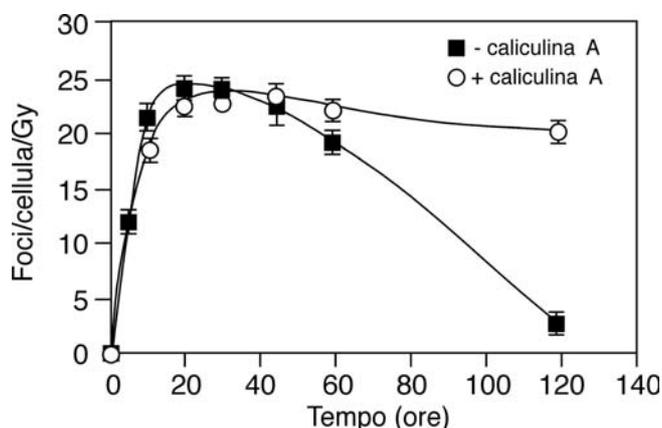


Figura 5. Cinetiche di fosforilazione-defosforilazione dell'istone H2AX dopo irraggiamento con 1 Gy di raggi gamma. Le cellule sono state successivamente incubate in assenza o in presenza di calcicolina A. Le barre d'errore rappresentano l'errore standard sulla media di almeno 3 esperimenti. Non è stata fatta alcuna sottrazione del numero di foci del controllo (circa 0,08 foci/cell/Gy)

## Defosforilazione di $\gamma$ -H2AX e ricongiungimento delle DSB

Per capire se la presenza del gruppo fosfato sulla serina 139 dell'istone  $\gamma$ -H2AX potesse ostacolare il ricongiungimento delle DSB, fibroblasti umani sono stati incubati in presenza e in assenza di calcicolina A per intervalli di tempo da 0 a 2 ore dall'irradiazione con 20 e 80 Gy di raggi gamma (Figura 6a e b). Le cellule sono state quindi inglobate in agarosio, lisate e il DNA è stato sottoposto a PFGE come descritto da Belli *et al.* (24). In entrambi i casi sono state ottenute le stesse cinetiche di ricongiungimento delle DSB, indipendentemente dalla presenza di calcicolina A. La mancata rimozione del gruppo fosfato non sembra quindi rappresentare un ostacolo per l'attività degli enzimi coinvolti nella riparazione delle DSB.

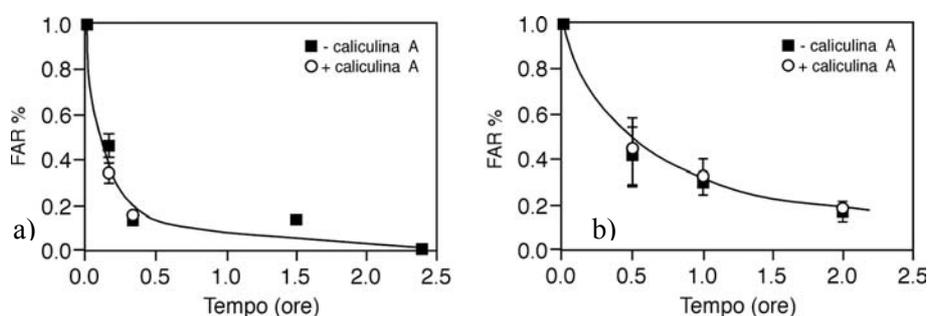
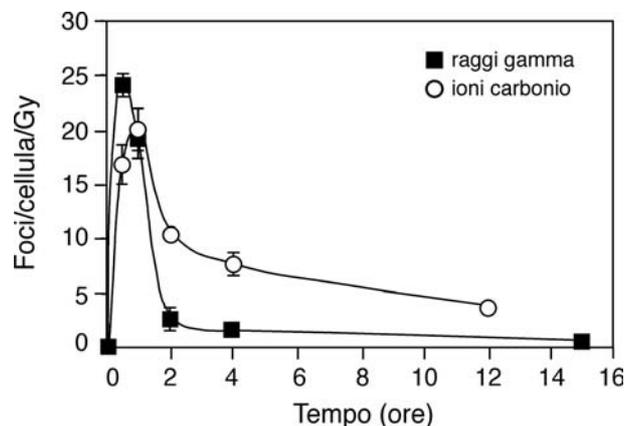


Figura 6. Cinetiche di ricongiungimento delle doppie rotture indotte nel DNA ottenute mediante analisi della FAR (24). Le barre d'errore rappresentano l'errore standard sulla media di 2 esperimenti

## Confronto tra raggi gamma e ioni carbonio

Per studiare l'influenza della qualità della radiazione sulle cinetiche di fosforilazione-defosforilazione dell'istone H2AX, sono stati condotti esperimenti con ioni carbonio (di energia pari a 62 MeV/u). Il confronto con i risultati ottenuti a seguito di irradiazione gamma ha mostrato che i foci di fosforilazione che si osservano a seguito di irradiazione con ioni carbonio hanno dimensioni maggiori, sono più irregolari e, a parità di dose (1 Gy), il loro numero massimo è inferiore (19 rispetto a 24) e si ottiene a tempi di incubazione più lunghi (circa 1 ora rispetto a 30 minuti). Inoltre, il numero di foci ancora presenti dopo 2 ore di incubazione è circa 4 volte maggiore di quello che si osserva dopo irradiazione gamma e questa maggiore persistenza è ancora osservabile dopo 12 ore (Figura 7).

È importante considerare che il massimo numero di foci che si osserva dopo irradiazione con ioni carbonio è confrontabile con il numero di tracce che attraversando il nucleo cellulare producono almeno 1 DSB. Le caratteristiche morfologiche dei foci e la loro persistenza sono coerenti con l'ipotesi di una maggiore complessità del danno (DSB associate ad altre DSB o ad altri tipi di lesioni) indotto da ioni carbonio che risulta quindi più difficilmente riparabile da parte della cellula rispetto a quello indotto da raggi gamma.



**Figura 7. Cinetiche di fosforilazione-defosforilazione dell'istone H2AX dopo irraggiamento con 1 Gy di raggi gamma o ioni carbonio. Le barre d'errore rappresentano l'errore standard sulla media di 2 esperimenti. Non è stata fatta alcuna sottrazione del numero di foci del controllo (circa 0,08 foci/cell/Gy)**

## Ringraziamenti

Gli autori ringraziano i colleghi dei Laboratori Nazionali del Sud dell'INFN per il supporto durante gli esperimenti di irradiazione con ioni carbonio presso il Ciclotrone Superconduttore.

Ringraziamenti vanno anche a Marco Sabatini del Dipartimento di Tecnologie e Salute per il contributo alla grafica e alla preparazione del manoscritto.

## Bibliografia

1. Tubiana M, Dutreix J Wambersie A. *Introduction to Radiobiology*. Taylor & Francis (London, New York, Philadelphia).
2. Zhou BBS, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 2000;408:433-39.

3. Abraham RT. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Gene Develop* 2001;15:2177-96.
4. Bartek J, Lukas J. Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr Opin Cell Biol* 2001;13:738-47.
5. Pierce AK, Mphrey TC. Integrating stress-response and cell-cycle checkpoint pathways. *Trends in Cell Biology* 2001;11:426-33.
6. Valerie K, Povirk LF. Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene* 2003;22:5792-12.
7. Lees-Miller SP, Meek K. Repair of DNA double strand breaks by non-homologous end joining. *Biochimie* 2003;85:1161-73.
8. Dudàs A, Chovanec M. DNA double strand break repair by homologous recombination. *Mutat Res* 2004;566:131-67.
9. Jeggo PA. DNA-PK: at the cross-road of biochemistry and genetics. *Mut Res* 1997;384:1-14.
10. Abraham RT. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Gene Develop* 2001;15:2177-96.
11. Critchlow SE, Bowater RP, Jackson SP. Mammalian DNA double-strand break repair protein XRCC4 interacts with DNA ligase IV. *Curr Biol* 1997;7:588-98.
12. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. DNA double strand breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 1998;273:5858-68.
13. Fernandez-Capetillo O, Lee A, Nussenzweig M, Nussenzweig A. H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA repair* 2004;3:959-67.
14. Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* 1999;146:905-15.
15. Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V, Kirchgessner CU, Gellert M, Bonner WM. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol* 2000;10:886-95.
16. Ward I M, Chen J. Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J Biol Chem* 2003;278:19579-82.
17. Kobayashi J, Tauchi H, Sakamoto S, Nakamura A, Morishima K, Matsuura S, Kobayashi T, Tamai K, Tanimoto K, Komatsu K. NBS1 localizes to g-H2AX foci through interaction with the FHA/BRCT domain. *Curr Biol* 2002;12:1846-51.
18. Celeste A, Fernandez-Capetillo O, Kruhlak MJ, Pilch DR, Staudt DW, Lee E, Bonner RF, Bonner WM, Nussenzweig A. Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat Cell Biol* 2003;5:675-79.
19. Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 2001;276:42462-67.
20. Stiff T, O'Driscoll M, Rief N, Iwabuchi K, Lobrich M, Jeggo PA. ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Canc Res* 2004;64:2390-96.
21. Nazarov IB, Smirnova AN, Krutilina RI, Svetlova MP, Solovjeva LV, Nikiforov AA, Oei S-L, Zalenskaya IA, Yau PM, Bradbury EM, Tomilin NV. Dephosphorylation of histone g-H2AX during repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells and its inhibition by calyculin A. *Radiat Res* 2003;160:309-17.
22. Sedelnikova OA, Rogakou EP, Panyutin IG, Bonner WM. Quantitative detection of 125IdU-induced DNA double-strand breaks with g-H2AX antibody. *Radiat Res* 2002;158:486-92.

23. Antonelli F, Belli M., G.Cuttone, Dini V, Esposito G, Simone G, Sorrentino E, Tabocchini MA. Induction and repair of DNA double-strand breaks in human cells: dephosphorylation of histone H2AX and its inhibition by calyculin A. *Radiat Res* 2005;164 (in press).
24. Belli M, Cherubini R, Dalla Vecchia M, Dini V, Esposito G, Moschini G, Sapora O, Simone G, Tabocchini MA. DNA fragmentation in V79 cells irradiated with light ions as measured by pulsed-field gel electrophoresis. I. Experimental results. *Int J Radiat Biol* 2002;78:475-82.

# EFFETTI FOTOTOSSICI INDOTTI DALL'INTERAZIONE LUCE-FARMACI: MECCANISMI D'AZIONE A LIVELLO CELLULARE E MOLECOLARE

Beatrice Di Carlo, Gina La Sala, Antonella Maggi, Orazio Saporà  
Dipartimento Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria

## Introduzione

Il mutamento dello stile di vita della popolazione, che comporta una maggiore esposizione alla luce solare, insieme all'uso sempre più frequente di sostanze chimiche utilizzate in differenti campi (cosmesi, medicina, agricoltura), ha reso attuale e importante lo studio dell'interazione tra sistemi biologici, luce ultravioletta e sostanze. Infatti, gli effetti dell'UVA e UVB, presenti nello spettro solare, sui sistemi biologici sono in gran parte mediate dall'azione fotosensibilizzante di sostanze endogene e/o esogene il cui meccanismo di sensibilizzazione è basato o sulla capacità di assorbire le radiazioni in quest'intervallo spettrale o di perturbare la struttura elettronica delle biomolecole con le quali interagiscono alterandone le proprietà di assorbimento. Tali reazioni possono avvenire sia in assenza che in presenza di O<sub>2</sub>, tuttavia le reazioni aerobiche sono di gran lunga le più importanti.

Effetti di fotosensibilizzazione possono essere indotti da un largo spettro di sostanze chimiche, sia di origine industriale che di comune impiego in terapia, che possono entrare nell'organismo tramite ingestione, inalazione o iniezione, o per applicazioni topiche sulla pelle. Per avere effetti di fotosensibilità è necessario che vi sia un accumulo del fotosensibilizzante all'interno dell'organismo e che sia il suo assorbimento che la sua distribuzione a livello tissutale siano più efficienti dei relativi processi di detossificazione e d'escrezione.

Le reazioni di fotosensibilizzazione sono state studiate estensivamente da Foote *et al.* (1) e Spikes *et al.* (2) e sono riportate schematicamente in Figura 1.

La specie elettronicamente eccitata a vita breve, che si forma in seguito all'assorbimento iniziale di energia da parte del fotosensibilizzante, può essere o allo stato di singoletto o di tripletto. Il singoletto è il prodotto iniziale dell'assorbimento di luce, mentre il tripletto di solito ha una emivita relativamente molto più lunga. I fotosensibilizzanti più attivi sono di solito quelli che risultano dalla formazione dello stato di tripletto (3).

In sistemi semplici, il tripletto può partecipare a due reazioni: (a) trasferimento di elettroni o di idrogeno (*free radicals*) (reazioni di tipo I), che può o non richiedere la presenza di ossigeno; (b) trasferimento di energia all'ossigeno con formazione di ossigeno singoletto (reazioni di tipo II). Lo sviluppo delle reazioni di tipo I e di tipo II dipende dalla natura del fotosensibilizzante e del substrato, e dalle condizioni di reazione (solvente, pH, e concentrazione del fotosensibilizzante, del substrato e dell'ossigeno).

L'ossigeno singoletto possiede una forte elettrofilicità per questo reagisce solo con substrati in grado di donare elettroni. I substrati che sono già ossidati o ridotti invece favoriscono le reazioni tipo *free radicals*. Tra le molecole di interesse biologico gli acidi grassi insaturi e il colesterolo possono reagire con entrambi i meccanismi come la guanina che può essere ossidata con reazioni sia di tipo I che di tipo II. Il fotosensibilizzante allo stato di tripletto, l'ossigeno singoletto e i differenti radicali che si formano, hanno una emivita breve, dell'ordine di frazioni

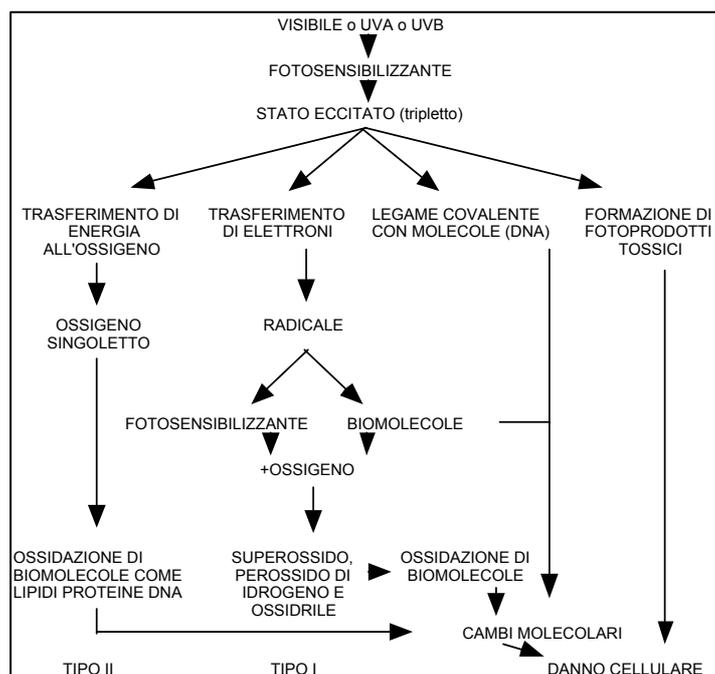
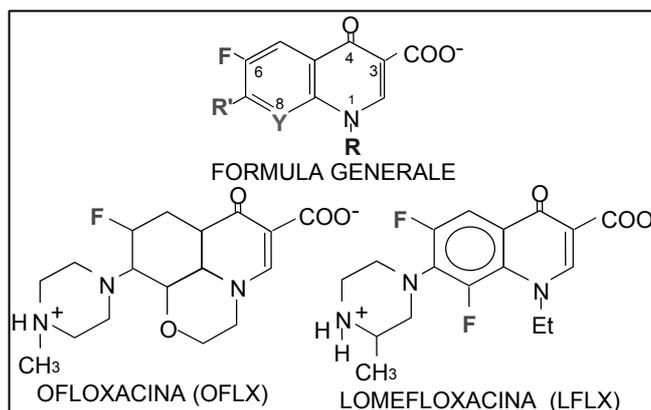


Figura 1. Schema dei fenomeni legati all'interazione luce-sostanza fotosensibilizzante

di millisecondi e per poter produrre fenomeni fototossici devono essere prodotti nelle immediate vicinanze del bersaglio biologico. Tutte le strutture cellulari e le macromolecole biologiche possono essere bersaglio dei radicali che si formano e l'ampiezza dell'effetto dipende da tutti quei fattori che regolano prima del trattamento radiante l'associazione tra la sostanza e l'ambiente cellulare. Un importante fattore, è la localizzazione del fotosensibilizzante nei differenti compartimenti cellulari, che dipende soprattutto dal coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua, dalla solubilità, dalla natura ionica e dal volume molecolare del fotosensibilizzante.

## I Fluorochinoloni

Attualmente sono in commercio numerose sostanze destinate ad uso farmaceutico, cosmetico, alimentare e agricolo, in grado di dar luogo a fenomeni di fototossicità (4). Tra i prodotti di comune impiego in terapia antibatterica una importante famiglia di sostanze è quella dei chinoloni che presenta un marcato effetto fotosensibilizzante che ne può limitare l'impiego (5, 6). I principali chinoloni, oggi in commercio, sono analoghi sintetici fluorurati dell'acido nalidixico, i fluorochinoloni (FQ) (Figura 2), che contengono un gruppo carbossilico in posizione 3 dell'anello base e una o due molecole di fluoro in posizione 6 e 8. Queste sostanze offrono potenzialmente tutte le caratteristiche richieste ad un agente chemioterapico ideale: somministrazione orale e parenterale, largo spettro d'azione, alti livelli plasmatici e tissutali, e relativamente bassa incidenza di seri effetti collaterali. Negli ultimi 15 anni i chimici mondiali hanno tentato di rendere queste caratteristiche potenziali una realtà e le modifiche apportate hanno prodotto un notevole miglioramento nella potenza, nello spettro e nell'efficacia *in vivo*



**Figura 2. Formula generale dei chinoloni**

Risultano attivi nei confronti di numerosi batteri gram-positivi e gram-negativi. Il target principale di queste sostanze è la DNA-girasi batterica che ha funzioni simili alla topoisomerasi II dei mammiferi. Le due catene della struttura a doppia elica del DNA, affinché si verifichi la duplicazione o la trascrizione, devono essere separate e tale separazione determina un superavvolgimento positivo del DNA nel punto iniziale. Per eliminare questo ostacolo meccanico l'enzima batterico DNA-girasi, introduce, in modo continuo, superavvolgimenti negativi mediante una reazione ATP-dipendente che richiede il taglio di entrambe le catene del DNA. L'azione dei chinoloni consiste nel bloccare la sintesi del DNA batterico inibendo l'attività della DNA-girasi, e impedendo quindi lo svolgimento del DNA superavvolto, necessario per i suddetti processi.

Una caratteristica essenziale di questa classe di chemioterapici è la possibilità di modularne l'attività mediante sostituzione dei gruppi laterali, che sono legati a specifiche funzioni della molecola (9). Per esempio è risultato che i gruppi in posizione 3 e 4 sono essenziali per l'attività antibatterica, perché partecipano alla formazione del complesso con la DNA-girasi. La capacità chelante di questi gruppi vicini è anche importante per il trasporto del farmaco all'interno delle cellule batteriche (10, 11), mentre il fluoro in posizione 8 e/o in posizione 6 è essenziale per l'efficacia terapeutica ma è legato agli effetti fotosensibilizzanti. Nella Figura 2 sono riportate le formule di struttura di due fluorochinoloni la ofloxacina (OFLX), con un solo atomo di fluoro e la lomefloxacina (LFLX) che possiede due atomi di fluoro nella molecola.

Il meccanismo di fototossicità non è stato ancora del tutto compreso. In letteratura vi sono studi (12) anche contrastanti indicanti che i fluorochinoloni inducono perossidazione lipidica delle membrane (13), danno al DNA (14) e citotossicità in colture cellulari (15) e che gli effetti sono inibiti da vari *scavengers* delle specie reattive dell'ossigeno (ROS). I meccanismi chimico-fisici sono riportati in dettaglio da Albini e Monti (16). In generale tutti i farmaci di questa classe subiscono, in ambiente acquoso, defluorinazione e i radicali che si formano sono i responsabili dei fenomeni di fototossicità.

Uno schema generale dei processi fotochimici, che possono generare fenomeni di fototossicità, è riportato in Figura 3. L'assorbimento iniziale di energia luminosa produce inizialmente una reazione di defluorinazione con la formazione di due radicali che possono essere restituiti se è presente un donatore di idrogeno. Le reazioni che seguono sono di preferenza dipendenti dalla presenza dell'ossigeno con produzione di specie reattive a vita breve che possono danneggiare tutte le biomolecole e le strutture cellulari.

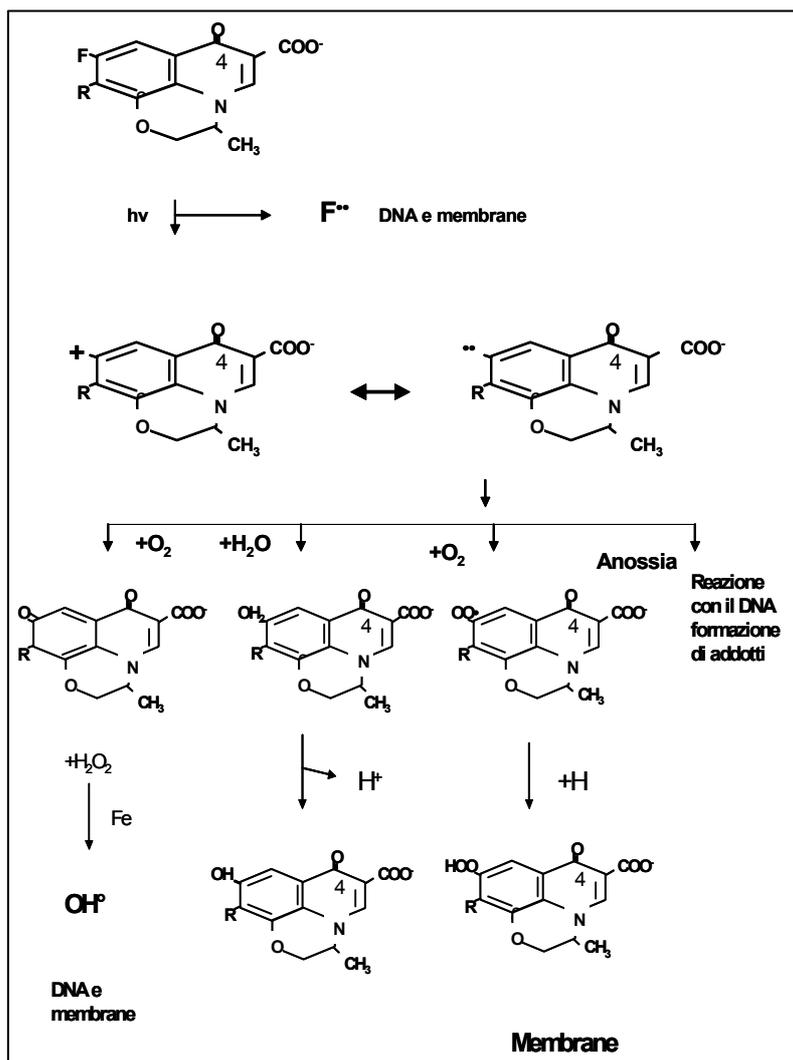


Figura 3. Schema delle possibili reazioni a cui può andare incontro un fluorochinolone dopo l'assorbimento iniziale di energia luminosa

È stato ipotizzato che tutti gli intermedi che si formano, siano attivi nel processo di fotosensibilizzazione e che mentre il  $FQ^\circ$  ha più alta efficienza nel produrre danni al DNA, i ROS possano essere i principali responsabili del danno alla membrana (14).

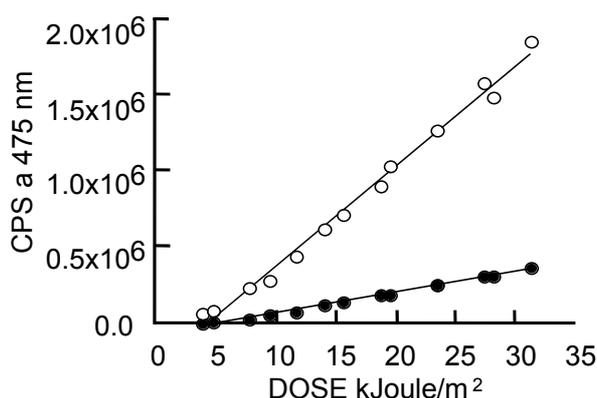
Tuttavia questi dati derivano da una serie di studi condotti con sistemi *in vitro*, come DNA plasmidico e liposomi, pertanto è possibile che in cellule i radicali coinvolti nel danno al DNA e alla membrana non siano gli stessi o che, se gli stessi, siano distribuiti differentemente all'interno dei vari compartimenti cellulari. Inoltre questi dati sembrano essere in contrasto con l'evidenza sperimentale che l' $OH^\cdot$  è un efficiente produttore di danni sul DNA. In cellule trattate con radiazioni ionizzanti la maggioranza dei danni prodotti, che ammontano a circa 1000 singole rotture e 3000 danni alle basi per Gy, possono essere attribuiti all'effetto indiretto che è mediato dalle specie reattive dell'ossigeno. Infatti sostanze *scavengers* del radicale  $OH^\cdot$ , come il DMSO e la cisteammina, riducono di circa l'80% l'ammontare di questi danni (17). Inoltre,

l'ambiente costituito dal complesso delle membrane cellulari è fortemente lipofilo e le molecole d'acqua, da cui si può formare  $H_2O_2$  e il radicale  $OH^\circ$ , sono presenti solo a contatto con la parte idrofila esterna del doppio strato lipidico. Sembra più probabile che nelle cellule il danno al DNA possa venire prodotto dal radicale  $FQ^\circ$ , che può formare addotti, e dal radicale  $OH^\circ$ , che produce singole rotture e danni alle basi, mentre, nel doppio strato lipidico che costituisce la membrana, sia il radicale FQ che il radicale fluoro, sottraendo un idrogeno dalla catena di acidi grassi insaturi, possano dare origine alle reazioni di perossidazione.

## Produzione di specie reattive dell'ossigeno

È possibile evidenziare e valutare la formazione di ROS prodotte dall'interazione luce-farmaco impiegando sia tecniche *in vitro* che *in vivo* su cellule in normali condizioni di crescita.

Nel primo caso si espone a dosi scalari di UVA una soluzione tamponata di cumarina e della sostanza da esaminare. Se l'interazione luce sostanza produce radicali  $OH^\circ$  questi interagiscono con la cumarina dando luogo a 7-OH-cumarina caratterizzata da uno spettro di emissione di fluorescenza tra i 400 e i 520 nm (18). Sono stati esaminati insieme alla OFLX e alla LFLX altri FQ e per tutti vi è un aumento lineare della fluorescenza in funzione della dose, sebbene con differente efficienza. Nella Figura 4 sono riportate le cinetiche di formazione di ROS in funzione della dose di UVA per la LFLX e la OFLX. La prima produce un ammontare di 7-OH-cumarina circa 5 volte maggiore di quella prodotta da OFLX ( $7.6 \times 10^{-9}$  contro  $1.58 \times 10^{-9}$  moli/lit per  $kJoule/m^2$ ). La formazione di  $OH^\circ$  è evidente *in vitro* in un sistema semplice a due componenti, che non è direttamente confrontabile con l'ambiente presente all'interno di una cellula dove vi è una alta concentrazione di sostanze in grado di reagire con i radicali che si formano. Anche in sistemi cellulari è possibile, tuttavia, dimostrare la formazione di ROS impiegando un probe fluorescente specifico e tecniche di citofluorimetria (19). In questo caso sono state impiegate due linee cellulari umane, le HL60 e le K562 (20, 21). Con ambedue le linee si ottiene un marcato aumento della fluorescenza interna alle cellule quando queste sono trattate con UVA in presenza di LFLX. Tale effetto è minore quando viene impiegata la OFLX. Queste due evidenze sperimentali mostrano che: (a) i FQ interagendo con UVA producono in funzione della dose assorbita ROS, (b) l'efficienza di tale produzione dipende dal FQ impiegato e (c) l'effetto è valutabile sia *in vitro* che *in vivo* in cellule in condizioni di crescita.



**Figura 4. Produzione di specie reattive dell'ossigeno, espressa come conte per secondo (CPS) di fluorescenza a 475 nm, in funzione della dose di UVA a 330 nm. La lunghezza d'onda di eccitazione è di 360 nm. La soluzione tamponata contiene Ofloxacin (simboli chiusi) o Lomefloxacin (simboli aperti) alla concentrazione di 0,05 mM e cumarina 0,5 mM**

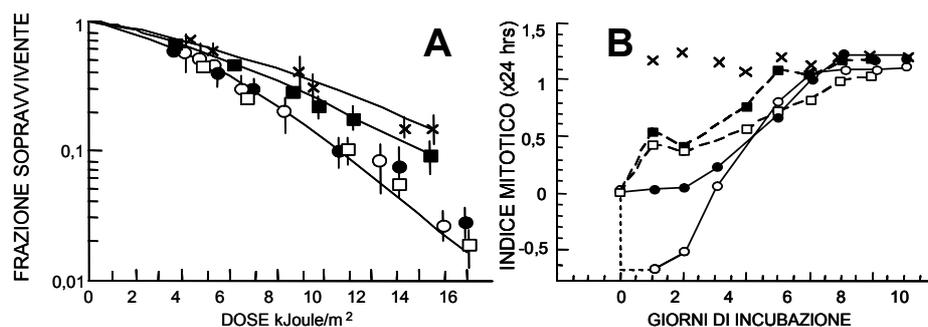
## Meccanismi di fototossicità

Sono stati studiati i meccanismi di azione dei due fluorochinoloni, correlando tra loro, nello stesso campo di dose, l'effetto citotossico, la *recovery* cellulare, il danno sulle membrane, il danno sul DNA e la sua riparazione.

Le due linee cellulari, K562 e HL60, mostrano una differente sensibilità al danno di tipo ossidativo introdotto sia da radiazioni ionizzanti che da radiazioni ultraviolette (22). L'effetto letale prodotto da UVA e da radiazioni ionizzanti nelle HL60 è maggiore di quello prodotto nelle K562. Impiegando tecniche di fluorescenza statiche e dinamiche è stato inoltre dimostrato che le HL60 sono anche più sensibili al danno ossidativo sulle membrane e che tale sensibilità diminuisce con l'età della cellula (22, 23, 24). Tuttavia, se le due linee cellulari vengono esposte alla combinazione FQ-luce, l'effetto fototossico relativo, cioè l'aumento di sensibilità di cellule irradiate in presenza di FQ rispetto a cellule irradiate in sua assenza, è simile nelle due linee cellulari e tale effetto, nel caso della OFLX, permane anche dopo la rimozione del farmaco, al contrario se la LFLX è presente, l'effetto diminuisce drasticamente (Figura 5A).

Se si segue la *recovery* cellulare nel tempo si nota un'altra differenza di comportamento nelle cellule trattate con le due sostanze. Se durante l'esposizione agli UVA è presente l'OFLX, nelle prime 24 ore che seguono al trattamento si nota una forte diminuzione del numero di cellule dovuta a fenomeni di lisi, tale comportamento non è evidenziabile con la LFLX (Figura 5B).

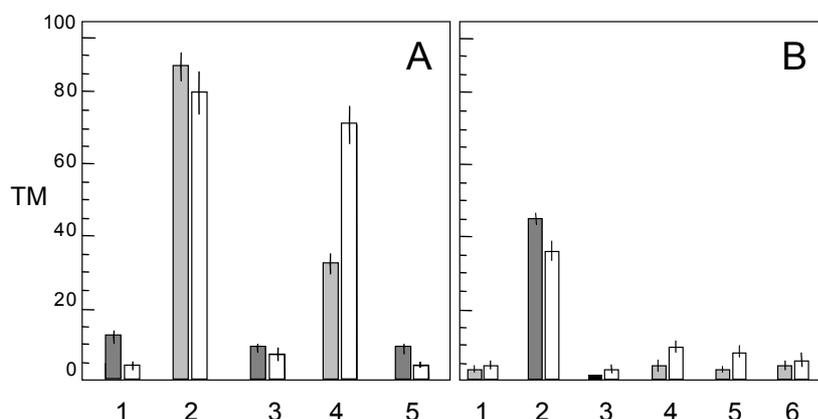
Un ulteriore dato da prendere in considerazione è quello relativo all'alterazione relativamente stabile nel tempo, introdotta dall'OFLX, nell'organizzazione e nell'ordine delle membrane cellulari (25). Tali dati sono stati ottenuti mediante impiego di una tecnica di fluorescenza statica basata sull'uso di *probes* fluorescenti, detti *frame shift* che cambiano, verso il blu o verso il rosso, il loro spettro di emissione in funzione dell'organizzazione del doppio strato lipidico (26). Questa tecnica, detta di Polarizzazione Generalizzata (GP), è applicabile a cellule integre e vitali e nello stesso campo di dose in cui viene misurata la fotocitotossicità. Il trattamento con OFLX aumenta il valore di GP che rimane costante per oltre due ore anche dopo la rimozione del farmaco, al contrario quando le cellule sono trattate con LFLX il valore di GP è simile ai valori di controllo. Questo dato indica che la OFLX si localizza preferenzialmente nel compartimento delle membrane cellulari e che tale localizzazione si protrae nel tempo anche dopo la rimozione del farmaco dalla sospensione cellulare (27, 28).



**Figura 5. Effetto fototossico (A) e sul recovery cellulare (B) di OFLX (circoli) e LFLX (quadrati) su cellule HL60 irradiate con differenti dosi di UVA di 330 nm. Le cellule sono state irradiate in presenza dei due fluorochinoloni alla concentrazione di 0,025 mM (simboli aperti) o dopo incubazione per due ore in presenza del FQ e sua rimozione prima del trattamento radiante (simboli chiusi). Il recovery cellulare (B) è stato valutato seguendo il recupero nel tempo dell'indice mitotico. Le cellule sono state trattate con due dosi di UVA, 8 (simboli chiusi) e 12 (simboli aperti) kJ/m<sup>2</sup>. Il simbolo (x) rappresenta in A i risultati ottenuti irradiando le cellule con solo UVA mentre in B rappresenta l'indice mitotico di cellule non trattate**

Sulla base di questi dati di fotocitotossicità, *recovery* cellulare, alterazione e danno sulle membrane cellulari, si era ipotizzato che le membrane cellulari fossero il bersaglio più importante nei processi di foto-sensibilizzazione FQ dipendenti. Questa ipotesi sembrava confermata dai dati presentati da Ouedrago et al (29). Questi ricercatori, sfruttando la caratteristica dei fluorochinoloni di possedere una forte fluorescenza, ne hanno studiato la distribuzione in differenti compartimenti cellulari in fibroblasti umani. Hanno dimostrato che vi è un accumulo preferenziale di questi farmaci nelle membrane e in quelle liposomiali in particolare. Tuttavia tale fenomeno dipende dal FQ impiegato e non vi è una diretta correlazione con la gravità dell'effetto fototossico. La OFLX è nel gruppo di FQ in cui la fluorescenza è intensa al contrario della LFLX che mostra al microscopio una bassa intensità di fluorescenza.

I risultati ottenuti mostrano che, a parità di dose, la LFLX, in linea con la sua maggior efficienza nella produzione di OH<sup>•</sup>, è circa 2.5 volte più efficace della OFLX nel produrre ssb sul DNA (Figura 6A) e che tale danno viene rapidamente riparato (Figura 7A). La rimozione dei due FQ prima dell'esposizione agli UVA provoca la scomparsa del danno sul DNA (Figura 6A). Nelle stesse condizioni tuttavia l'effetto fototossico della OFLX permane mentre quello prodotto dalla LFLX tende a scomparire (Figura 5A). Questo è una chiara indicazione che i danni iniziali sul DNA non sono direttamente correlabili con i fenomeni di fototossicità e che i due FQ agiscono su target differenti.

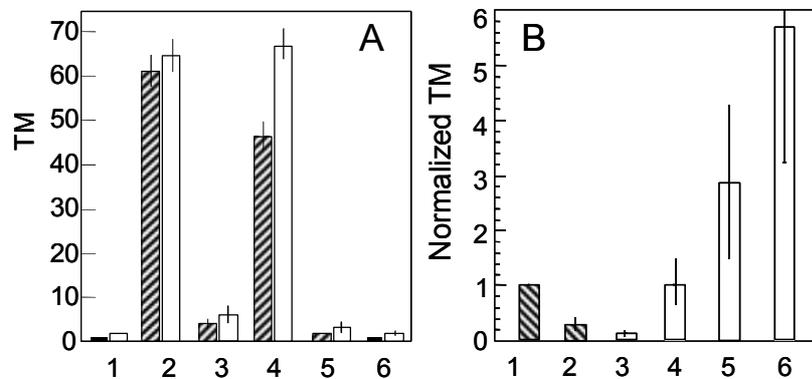


**Figura 6. Danno al DNA di cellule HL60, trattate secondo differenti protocolli sperimentali. Le barre tratteggiate rappresentano i risultati ottenuti in presenza di OFLX mentre quelle chiare in presenza di LFLX. (A): Comet Assay alcalino per la misura delle singole rotture della catena del DNA (ssb): (1), cellule non trattate; (2), cellule irradiate con 4 Gy di raggi gamma; (3), cellule irradiate con 2 kJ/m<sup>2</sup> di UVA a 330 nm; (4), cellule irradiate con UVA in presenza di 0.025 mM di FQ; (5), cellule trattate per due ore con FQ che è rimosso immediatamente prima dell'esposizione. (B): Comet Assay in ambiente neutro per la valutazione delle doppie rotture ( dsb). (1), cellule non trattate. (2), cellule irradiate con 30 Gy di radiazioni ionizzanti. (3), cellule irradiate con 15 kJ/m<sup>2</sup>. (4), (5), e (6), cellule irradiate in presenza di FQ 0.025 mM con 5, 10 e 15 kJ/m<sup>2</sup>.**

Questa serie di dati e l'ipotesi che identifica il complesso delle membrane cellulari come il bersaglio principale dell'interazione FQ-UVA può spiegare i dati di fototossicità ottenuti con l'OFLX ma contrasta con i risultati ottenuti con la LFLX. Queste differenze nel meccanismo di azione fototossica tra OFLX e LFLX possono essere spiegate o ipotizzando differenti meccanismi chimico-fisico che agiscono sullo stesso o su differenti bersagli o ipotizzando lo stesso meccanismo chimico-fisico ma che agisce su bersagli differenti.

È opinione corrente che il danno sul DNA, data la sua struttura e la sua funzione, rivesta una particolare importanza nei processi di sensibilizzazione legati al danno ossidativo. Ciò è sottolineato dalla presenza nella cellula di differenti sistemi passivi e attivi di protezione tra cui la rimozione enzimatica del danno stesso.

Per poter studiare l'effetto dei radicali che si formano dall'interazione luce-farmaco sulla molecola del DNA cellulare, HL60 e K562 sono state esposte a UVA in presenza e in assenza di OFLX o LFLX. L'ammontare del danno, singole (ssb) e doppie (dsb) interruzioni della catena del DNA, è stato valutato mediante la tecnica del *Comet Assay* in ambiente alcalino o in ambiente neutro. Il *Comet Assay* è una elettroforesi a singola cellula. Se il DNA cellulare è danneggiato per la presenza di singole (ssb) o doppie (dsb) rotture si ha la formazione sotto l'effetto del campo elettrico di una caratteristica figura a forma di cometa. Il danno prodotto può essere valutato mediante appositi programmi che prendono in considerazione i vari parametri ottenuti dall'analisi dell'immagine della cometa. Il più usato di tali parametri è il Tail Moment (TM) che considera la lunghezza della coda della cometa e la quantità di fluorescenza presente nella stessa (36, 37).

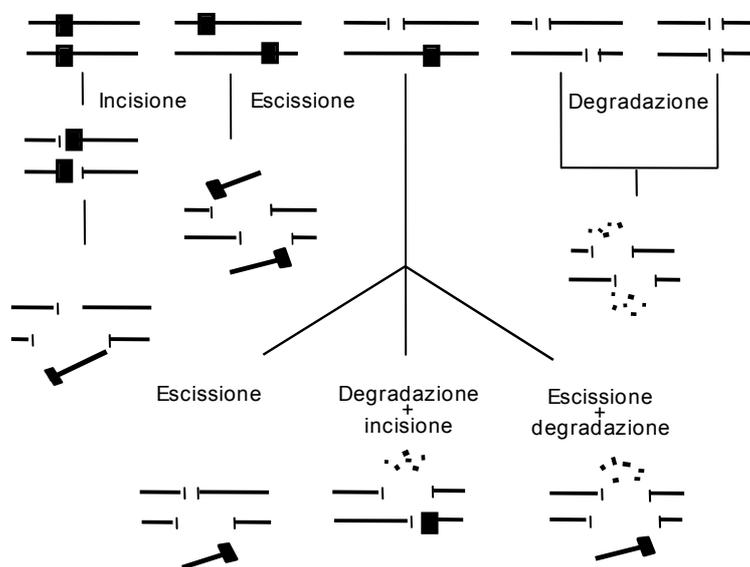


**Figura 7. (A) Riparazione dei danni al DNA valutata con il Comet alcalino. Le cellule HL60 subito dopo il trattamento UVA+FQ sono divise in due aliquote la prima processata immediatamente per la valutazione del danno iniziale (4) la seconda incubata in condizioni di crescita per 30 (5) e per 60 (6) minuti prima della esecuzione del Comet. Cellule non trattate (1), danno iniziale prodotto da una dose di 4 Gy di radiazioni ionizzanti (2) e dopo 60 minuti di riparazione (3). Barre tratteggiate, cellule trattate con 0.025 mM OFLX; Barre vuote, cellule trattate con 0.025 mM LFLX. (B). Riparazione dei danni al DNA valutata con il Comet neutro. In questo caso i valori di TM sono normalizzati al valore iniziale di danno prodotto in cellule trattate con radiazioni ionizzanti, fatto uguale ad 1. I campioni (1) e (2) rappresentano il danno iniziale e il danno presente dopo 60 minuti di riparazione in cellule irradiate con 30 Gy, (3), (4), (5), e (6) rispettivamente il danno iniziale e quello dopo 30, 60, 90 minuti di incubazione in cellule HL60 trattate con 10 kJ/m<sup>2</sup> di UVA in presenza di 0.025 mM di LFLX**

Un ulteriore passo nel chiarimento di quale sia il *target* biologico viene dagli esperimenti condotti con il *Comet* neutro. In queste condizioni la tecnica valuta la quantità di dsb sulla molecola del DNA. Questo tipo di danno viene considerato pericoloso per la vita cellulare poiché comporta una perdita di continuità della molecola e quindi dell'integrità dell'informazione. I valori di *Tail Moment* (TM), ottenuti subito dopo l'esposizione (Figura 6B), sono simili a quelli dei controlli indicando che l'interazione tra FQ e luce non produce direttamente doppie rotture sulla catena del DNA. A differenza di quanto accade con le radiazioni ionizzanti che sono impiegate come controllo positivo, il trattamento FQ-UVA

produce essenzialmente eventi singoli legati alla produzione di  $\text{OH}^\circ$ . Tuttavia incubando le cellule dopo trattamento LFLX-UVA, al contrario di quanto ottenuto con il *Comet* alcalino, si può notare un progressivo aumento di dsb (Figura 7B). Questo aumento è solo marginale o assente quando è impiegata la OFLX.

Il fenomeno può essere attribuito all'attività enzimatica di riparazione. I radicali  $\text{OH}^\circ$  che si formano non solo possono rompere il legame zucchero fosforo, ma possono interagire efficacemente anche con le basi azotate e lo zucchero dando origine a danni differenti da ssb. Solo questi ultimi danni possono essere evidenziati dalla tecnica del *Comet* alcalino. Tuttavia la cellula per rimuovere i danni alle basi deve incidere la catena del DNA producendo così una interruzione di origine enzimatica. Nel caso di due danni vicini ma opposti vi è una alta probabilità di introdurre una dsb (Figura 8). Inoltre come proposto da Sortino *et al.* (14) anche il radicale  $\text{FQ}^\circ$  che si forma può reagire con la molecola di DNA dando addotti che possono essere, a loro volta, origine di ssb per via enzimatica. Il progressivo accumulo di dsb può essere dovuto quindi all'azione contemporanea dei due radicali. Infatti vi è una alta probabilità che questi, avendo vita media molto breve e non potendo diffondere molto lontano, producano danni vicini e opposti.



**Figura 8. Schematizzazione delle possibili vie enzimatiche per la induzione di doppie rotture da singoli eventi**

È necessario in questo contesto prendere anche in considerazione l'organizzazione strutturale del bersaglio. Il DNA non è una molecola isolata ma è organizzata, con altre molecole, in differenti livelli strutturali. In cellule attivamente proliferanti la struttura è in continuo cambiamento a causa dei fenomeni di trascrizione e di duplicazione. È stato dimostrato che sia la produzione di danno radioindotto al DNA che la sua riparazione sono influenzati dalla complessità della struttura (30). In generale si può dire che il DNA presente in zone in attiva trascrizione è più sensibile al danno di quello presente in zone non trascritte e che la riparazione dei danni prodotti è più rapida in siti aperti che permettono un più facile accesso al danno da parte degli enzimi della riparazione (31, 32, 33). Se la diffusione del  $\text{FQ}^\circ$  è influenzata dalla complessa struttura della cromatina ci si può aspettare una concentrazione del farmaco

relativamente più alta in prossimità della molecola del DNA posto in zone in cui la struttura della cromatina è più aperta. Questo può portare alla formazione di danni *clusterizzati* cioè più danni localizzati nella stessa microarea, che durante la riparazione possono dare origine a dsb. Questa ipotesi sembra essere confermata dagli esperimenti condotti con cellule HL60 indotte al differenziamento sia di tipo granulocitico che macrofagico (34, 35).

Le linee cellulari impiegate negli esperimenti fin qui riportati sono in uno stadio di attiva proliferazione e non sincronizzate, questo comporta la presenza di percentuali variabili di cellule nelle differenti fasi del ciclo. Nel caso delle HL60 proliferanti circa il 40% è in fase S, 15% in fase G2 e il restante 45% in G1. In un organismo tuttavia la maggioranza delle cellule non è in uno stato di attiva proliferazione ma in uno stato quiescente dovuto ai processi più o meno terminali di differenziamento. Questo stato fisiologico comporta che le cellule siano in una fase di G0, con i processi di duplicazione del DNA assenti, un minore numero di geni in trascrizione e una differente e più compatta organizzazione della cromatina. Le HL60 dopo induzione al differenziamento sono state esposte alle stesse dosi a cui erano state esposte le cellule AP e sono state misurate le ssb. I risultati mostrano che con le radiazioni ionizzanti, il nostro controllo positivo, occorrono dosi più alte, circa 12 Gy, per ottenere livelli di danno simili. Questo effetto protettivo, esercitato dalla struttura più compatta e chiusa, è ancora più evidente se le cellule indotte al differenziamento vengono esposte ad UVA in presenza di LFLX. Cellule AP nelle stesse condizioni presentavano il numero più elevato di singole rotture sulla catena del DNA. Sia con HL60-granulociti che con HL60-macrofagi non vi sono evidenze di danno. I valori di TM infatti sono simili a quello delle cellule di controllo non trattate.

## Conclusioni

Un fluorochinolone a seconda delle sue caratteristiche chimico-fisiche si può localizzare di preferenza in due compartimenti uno altamente lipofilo, come quello rappresentato dal doppio strato lipidico delle membrane cellulari, e uno idrofilo, come quello che circonda il DNA nell'ambiente nucleare. La localizzazione nel primo compartimento comporta un "legame" più stabile anche dopo la rimozione del farmaco, infatti con la fluorescenza è possibile rilevare la presenza nelle membrane cellulari di alcuni FQ anche dopo 12 ore dalla rimozione. La localizzazione del FQ nel doppio strato lipidico produce due effetti, perturba l'organizzazione e l'ordine di membrana e in caso di esposizione ad UVA innesca processi a catena di perossidazione lipidica che possono portare alla lisi cellulare. In questo caso sia il radicale  $\text{OH}^\circ$  che i radicali  $\text{FQ}^\circ$  e  $\text{F}^\circ$  possono essere i responsabili dell'azione fototossica. Una parte tuttavia del farmaco è presente anche nel compartimento idrofilo e può produrre danni di tipo ossidativo, come le ssb e i danni alle basi, entrambi dipendenti da singole interazioni, che possono essere rapidamente ed efficacemente riparati dai sistemi enzimatici di riparazione presenti all'interno della cellula.

Nel caso di FQ con un differente coefficiente di ripartizione e con una maggiore efficienza nella produzione di  $\text{OH}^\circ$ , come nel caso della LFLX, si ha una maggiore concentrazione del farmaco nel compartimento nucleare con una maggiore probabilità di produrre danno localizzato e di introdurre, tramite gli enzimi della riparazione, danni potenzialmente letali come le doppie interruzioni sulla catena del DNA. Nel contempo vi sarà una minore concentrazione nel comparto delle membrane e quindi scarsa perossidazione lipidica e assenza di fenomeni di lisi.

In ambedue i casi la presenza di sostanze *scavenger* e variazioni della struttura del *target* specifico, come le variazioni nella concentrazione nelle membrane di colesterolo e di acidi grassi saturi e insaturi e come le variazioni della struttura e della complessità della cromatina, possono influenzare fortemente sia la produzione che la riparazione del danno.

## Bibliografia

1. Foote CS. Photosensitized oxidation and singlet oxygen: consequences in biological systems. In: W.A. Prior Free (Ed.). *Radicals in Biology*, Vol 2. New York: Academic Press; 1976: p. 5-133.
2. Spikes JD. Photosensitization. In K.C. Smith (Ed.). *The Science of Photobiology*, 2nd edn. New York: Plenum Press; 1989: p. 79-110.
3. Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Ann Rev Biochem* 1989;58:79-110.
4. Spielmann S, Lavell WW, Holzle E, Johnson BE, Maurer T, Miranda MA, Pape WJ, Saporà O, Sladowski D. In vitro Phototoxicology testing. *ATLA* 1994;2:314-48.
5. Poyer RJ. Adverse drug reactions with fluoroquinolones. *Pharmacovigilance* 1996;51:414-16.
6. Gentry LO. Review of quinolones in the treatment of infection of the skin and skin structure. *J Antimicrob Chemother* 1991;28 Suppl.C:97-110.
7. Hooper DC, Wolfson JS. Fluoroquinolones antimicrobial agents. *N Engl J Med* 1991;324:384-94.
8. Mitsuhashi S. Fluorinated quinolones – new quinolone antimicrobials. *Progr Drug Res* 1992;38:9-148.
9. Domagala JM. Structure-activity and Structure-side effect relationships for the quinolone antibacterials. *J Antimicrob Chemother* 1994;33:685-06.
10. Chu DTW, Fernandes PB. Recent development in the field of quinolone antibacterial agents. *Adv Drugs Res* 1991;21:39-144.
11. Asahina Y, Ishizaki T, Suzue S. Recent advances in structures-activity relationships in new quinolone. *Prog Drug Res* 1992;38:57-106.
12. Ferguson J. Fluoroquinolone Photosensitization: A review of clinical and laboratory studies. *Photochem Photobiol* 1995;62:954-58.
13. Kawada A, Hatanaka K, Gomi H, Matsuo I. In vitro phototoxicity of new quinolones: production of active oxygen species and photosensitized lipid peroxidation. *Photoderm Photoimmunol Photomed* 1999;15:226-30.
14. Sortino S, Condorelli C, De Guidi G, Giuffrida S. Molecular mechanism of photosensitization XI. Membrane damage and DNA cleavage photoinduced by Enoxacin. *Photochem Photobiol* 1998;68:652-659.
15. Wagai N, Tawara K. Possible direct role of reactive oxygen in the cause of cutaneous phototoxicity induce by five quinolones in mice. *Arch Toxicol* 1992;66:392-97.
16. Albinì A, Monti S. Photophysics and photochemistry of fluoroquinolones. *Chem Soc Rev* 2003;32:238-50.
17. Saporà O, Barone F, Belli M, Maggi A, Quintiliani M, Tabochini MA. Relationship between cell killing, mutation induction and DNA damage in X-irradiated V79 cells: The influence of oxygen and DMSO. *Int J Radiat Biol* 1991;60:467-82.
18. Botchway SW, Chakrabarti S, Makrigiorgos GM. Novel Visible and ultraviolet light photogeneration of hydroxyl radicals by 2-methyl-4-nitro-quinoline-N-oxide (MNO) and 4,4'-dinitro-(2,2') bipyridinyl-N,N''-dioxide (DBD). *Photochem Photobiol* 1998;67:635-640.
19. Yuan L, Inoue S, Saito Y, Nakajima O. An evaluation of the effects of cytokines on intracellular oxidative production in normal neutrophils by flow cytometry. *Experimet Cell Res* 1993;209: 375-81.
20. Saporà O, Maggi A, Maione B, Maresca V, Tabocchini AM. K562, a human cellular system capable to undergo *in vitro* differentiation: measurement of genotix parameters useful for cytotoxicity evaluation. *ATLA* 1993;21:50-56.

21. Zanetti C, Stammati A, Sapora O, Zucco F. Human leukemic HL60, an *in vitro* model for cell death endpoints identification. *ATLA* 1996;24:581-87.
22. Sapora O, Di Carlo B, Maggi A, Trisciuglio D, Giusti AM, Parasassi T. Meccanismo d'azione di agenti fotosensibilizzanti: studi a livello molecolare e cellulare. *Rapporti ISTISAN* 1998;98/13:30-33.
23. Giusti AM, Raimondi M, Ravagnan G, Sapora O, Parasassi T. Human cell membrane oxidative damage induced by single and fractionated doses of ionizing radiation: a fluorescence spectroscopy study. *Internal J Radiat Biol* 1998;74:595-05.
24. Levi M, Wilson P, Nguyen S, Iorio E, Sapora O, Parasassi T. In K562 and HL60 cells membrane ageing during cell growth is associated with changes in cholesterol concentration. *Mech Ageing Dev* 1997;97:109-19.
25. Trisciuglio D, Krasnowska E, Maggi A, Pozzi R, Sapora O. Phototoxic effect of fluoroquinolones on two human cell lines. *Toxicol in Vitro* 2002;16:449-56.
26. Parasassi T, Di Stefano M, Ravagnan G, Sapora O, Gratton E. Membrane aging during cell growth ascertained by Laurdan generalized polarization. *Exp Cell Res* 1992;202:432-39.
27. Sapora O, Maggi A, Pozzi R, Trisciuglio D, Krasnowska E, Parasassi T. Meccanismi di azione di agenti fotosensibilizzanti: studi a livello molecolare e cellulare. In: E. Ciranni (ed), Proprietà chimico fisiche dei medicinali e loro sicurezza d'uso, *Rapporti ISTISAN* 2000 00/18: p 65-76.
28. Sapora O, Maggi A, La Sala G, Proietti Panunzi C, Krasnowska E, Parasassi T. Studi di parametri molecolari e cellulari che regolano l'azione fototossica di fluorochinoloni. In E. Ciranni (ed), Terzo Progetto di Ricerca, Proprietà Chimico-Fisiche dei Medicamenti e loro Sicurezza d'Uso, *Rapporti ISTISAN* 2002; 02/42: p. 56-63.
29. Ouedrago G, Morliere P, Bazin M, Santus R, Miranda MA, Castell JV. Lysosomes are sites of fluoroquinolone photosensitization in human skin fibroblasts: a microspectrofluorometric approach. *Photochem Photobiol* 1999;70:123-29.
30. Maresca V, Sapora O, Tabocchini MA. Radiation induced damage on DNA of differentiated and actively proliferating cells: influence of genome structural organisation and of endogenous radioprotectors. *Phisica Medica* 1994; X:62-63.
31. Smerdon MJ. DNA repair and the role of chromatin structure. *Curr Opin Cell Biol* 1991;3:422-28.
32. Nospikel T, Hanawalt PC. DNA repair in terminally differentiated cells. *DNA Repair* 2002;1:59-75.
33. Tabocchini MA, Rothkamm K, Signorotti C, Risse J, Sapora O, Lobrich M. Formation and repair of DNA double strand breaks in gamma-irradiated K562 cells undergoing erythroid differentiation. *Mutat Res* 2000;461:71-82.
34. Jacob C, Leport M, Szilagyi C, Allen JM, Bertrand C, Lagente V. DMSO-treated HL60 cells: a model of neutrophil-like cells mainly expressing PDE4B subtype. *Int Immunopharmacol* 2002;2:1647-56.
35. Tonetti DA, Henning-Chubb C, Yamanishi DT, Huberman E. Protein kinase C- $\beta$  is required for macrophage differentiation of human HL-60 leukemia cells. *J Biol Chem* 1994;269:23230-35.
36. Anderson D, Plewa MJ. The international Comet Assay Workshop. *Mutagenesis* 1998;13:67-73.
37. Olive PL, Wlodek D, Durand RE, Banath JP. Factors Influencing DNA Migration from Individual Cells subjected to gel electrophoresis. *Exp Cell Res* 1992;198:259-67.
38. Olive PL, Wlodek D, Banat JP. DNA Double strand Breaks measured in individual cell subjected to gel electrophoresis. *Cancer Res* 1991;51:4671-76.

## IL PEROSSINITRITO COME INDUTTORE DI SENESCENZA ED APOPTOSI NELL'ERITROCITA: RUOLO DELLE ASPARTIL E CISTEINIL-PROTEASI

Rosa Vona (a), Lucrezia Gambardella (a), Elisabetta Straface (a), Paola Matarrese (a), Maurizio Minetti (b), Walter Malori (a), Donatella Pietraforte (b)

(a) Dipartimento del Farmaco

(b) Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze

### Introduzione

Gli eritrociti sono cellule “semplificate” che, esaurite le proprie capacità omeostatiche nei confronti di uno stimolo ossidante sono destinate alla senescenza prematura, quindi alla distruzione (1). Precedenti lavori hanno dimostrato che cellule rosse del sangue (*red blood cells*, RBC) di pazienti con differenti patologie associate a squilibrio ossido-riduttivo mostrano alterazioni sia strutturale che funzionale e biochimico (2). L'importanza di uno sbilancio ossido-riduttivo nelle RBC è stata infatti riconosciuta come un meccanismo patogenico di alcune malattie non specificamente ematologiche sia genetiche che acquisite (2). Su queste basi, lo scopo di questo lavoro è quello di mettere in correlazione i cambiamenti ossidativi indotti nei RBC dalle specie reattive dell'azoto dal perossinitrito (ONOO<sup>-</sup>, prodotto in seguito alla reazione tra anione superossido e ossido nitrico) con la patogenesi di alcune malattie umane ed, eventualmente, identificare specifici marcatori cellulari di degenerazione. In particolare, sono analizzate alcune molecole di superficie associate alla senescenza delle RBC con la loro rimozione dal circolo, come la glicoforina A (GA), e alcuni fenomeni tipici dell'apoptosi, come per esempio l'esternalizzazione della fosfadilserina (PS) (3, 4). Infatti, l'alterata espressione della GA a livello eritrocitario era stata osservata in diverse patologie, tra cui alcune malattie respiratorie (5, 6). Inoltre, l'esternalizzazione di PS, tipico marcatore precoce di apoptosi in cellule nucleate, è stata recentemente descritta come un indice di danno cellulare anche nelle RBC in patologie ematiche, come ad esempio nell'anemia falciforme (7-9). Sebbene nel globulo rosso, privo di mitocondri e nucleo, parlare di apoptosi risulti paradossale proprio perché sono cellule prive di alcuni regolatori mitocondriali che giocano un ruolo cardine nell'apoptosi delle cellule nucleate (es. caspasi-9, Apaf-1, citocromo c), le RBC rappresentano un interessante modello cellulare per lo studio del *pathway* apoptotico della membrana plasmatica (10, 11).

Sulla base di queste premesse, abbiamo impiegato RBC umane per analizzare gli effetti indotti dal perossinitrito (ONOO<sup>-</sup>, prodotto dalla reazione tra anione superossido e ossido nitrico). In condizioni fisiologiche, circa il 50% dell'ONOO<sup>-</sup> generato nel sangue attraversa le membrane delle RBC e viene disattivato all'interno della cellula (12, 13). In virtù della sua capacità ossidante e nitrante, ONOO<sup>-</sup> è considerato un importante mediatore infiammatorio (14, 15) e la principale specie nitrante di rilevanza biologica finora identificata.

## Materiali e metodi

### Isolamento degli eritrociti

Il sangue umano fresco eparinizzato è stato ottenuto da donatori sani, informati e consenzienti. Dopo una centrifugazione di 10 min a 1000 xg, il plasma e i leucociti sono stati rimossi e quindi le RBC sono state lavate tre volte con una soluzione tampone isotonica (PBS, pH 7,4).

### Preparazione del perossinitrito

Il perossinitrito è stato preparato a partire da nitrito di sodio e perossido d'idrogeno e stabilizzato con alcali come descritto in precedenza (16). Per eliminare l'eccesso di perossido d'idrogeno, il perossinitrito è stato trattato con diossido di manganese (6mg/ml, 30 min, 4 °C) il quale è stato eliminato mediante filtrazione. Con questo metodo si ottengono soluzioni con concentrazioni di ONOO<sup>-</sup>, misurate spettrofotometricamente a 302nm, comprese tra 200-300mM.

### Trattamenti

Salvo diversa indicazione, tutti i reagenti utilizzati sono stati forniti dalla Ditta Sigma (St. Louis, MO, USA). Dopo separazione dal plasma, le RBC sono state lavate e risospese in PBS con lo 0,25% di ematocrito (corrispondente ad una densità di  $25 \times 10^6$  cellule/ml) e trattate con un bolo di 50µM ONOO<sup>-</sup> (pH finale  $7,3 \pm 0,1$ ). La sospensione è stata immediatamente miscelata mediante vortex, centrifugata e lavata con PBS. Durante la procedura di preparazione non sono stati osservati eventi apprezzabili di lisi cellulare. Al fine di evitare possibili reazioni catalizzate dai metalli, il PBS è stato ampiamente trattato con Chelex 100 in presenza di 0,1mM di acido dietilenetriaminapenta-acetico (DTPA). Esperimenti di controllo sono stati eseguiti con ONOO<sup>-</sup> decomposto per escludere l'eventuale partecipazione di prodotti contaminanti il ONOO<sup>-</sup> negli effetti osservati. L'ONOO<sup>-</sup> decomposto è stato ottenuto aggiungendo ONOO<sup>-</sup> al PBS/DTPA e incubando per 5 min a temperatura ambiente. I trattamenti delle RBC con gli antiossidanti sono stati eseguiti, prima dell'aggiunta del ONOO<sup>-</sup>, utilizzando N-acetil-cisteina (NAC, 5mM) (Zambion, Milano, Italia) per 2 ore o la Quercitina (Quer, 50µM) (Sigma) per 30 min. Per gli esperimenti con gli inibitori delle proteasi (BOUTY, Milano, Italia), le RBC sono state pretrattate per 2 h con: 1) 50µM dell'inibitore della caspasi 9 LEHD-fmk; 2) 50µM dell'inibitore della caspasi 8 IETD-fmk; 3) 50µM dell'inibitore della caspasi 3 DEVD-fmk; 4) 50µM dell'inibitore della caspasi 2 VDAVD-fmk; 5) 50µM, dell'inibitore generico delle caspasi (ZVAD-fmk); 6) 100µM dell'inibitore della catepsina E, pepstatina A (CathI, Sigma); e 7) 10µM dell'inibitore specifico della calpaina (CalpI, Sigma) cui faceva seguito l'aggiunta di ONOO<sup>-</sup>. Negli esperimenti di chelazione del Ca<sup>2+</sup>, le RBC sono state incubate (1 h a 37 °C) con 1mM di EGTA prima dell'aggiunta di ONOO<sup>-</sup>. Gli esperimenti di recupero metabolico in presenza di glucosio sono stati eseguiti incubando le RBC trattate con ONOO<sup>-</sup> con 20mM di glucosio per 2 h a 37 °C. Le RBC trattate solamente con antiossidanti, inibitori delle proteasi, EGTA o glucosio sono state considerate come controlli.

### Rilevamento della metaemoglobina (Met-Hb)

Il contenuto di Met-Hb negli eritrociti è stato saggiato spettrofotometricamente (17) a seguito di lisi cellulare in tampone ipotonico freddo (5mM buffer fosfato, pH 8,0).

## **Elettroforesi e Western blotting**

Gli eritrociti sono stati lavati in PBS e lisati in 10 volumi di tampone sodio fosfato freddo a pH 8 contenente i seguenti inibitori proteasici: 0.1mM PMSF, 10µg/ml leupetina e 10µg/ml aprotinina. Dopo l'elettroforesi in 10% SDS-PAGE, le proteine sono state trasferite su una membrana di nitrocellulosa a 35V overnight e incubate con un anticorpo monoclonale contro la banda-3 (Sigma) (1:10.000) o dell'anticorpo monoclonale contro la caspasi-3 umana (Transduction Laboratories, Lexington, KY) (1:500), il quale è in grado di riconoscere sia la pro-caspasi che l'enzima attivo. Le membrane sono state lavate con 50mM Tris a pH 7.5, 150mM NaCl, 0.05% Tween 20 (TTBS) e la reazione è stata bloccata con una soluzione al 3% di albumina di siero bovino-TTBS per 2 h. I filtri di nitrocellulosa lavati sono stati incubati 2 ore a temperatura ambiente in presenza dell'anticorpo anti-mouse. A seguito di ripetuti lavaggi in TTBS, le bande immunoreattive sono state rivelate per mezzo di chemiluminescenza associata con l'attività perossidasi, in accordo con le specifiche del produttore (ECL kit, Pierce, Rockford, IL).

## **Shock osmotico indotto da NaCl**

Per analizzare la suscettibilità delle cellule allo shock osmotico, aliquote di 20µl delle RBC (sia di controllo che trattate con ONOO<sup>-</sup>) sono state aggiunte a 5ml di NaCl a differenti concentrazioni. Dopo 30 min di incubazione a temperatura ambiente, i campioni sono stati centrifugati (1000 xg per 10 min) e nei supernatanti è stata misurata l'adsorbanza a 540 nm mediante il Microplate Reader (Bio-Rad, Hercules, CA). In considerazione dei risultati ottenuti, sono qui riportati solo i dati ottenuti dagli esperimenti eseguiti con NaCl 90mM.

## **Microscopia elettronica a scansione (SEM)**

Dopo i differenti trattamenti descritti in precedenza, le RBC sono state raccolte e piastrate su vetrini ricoperti con poli-L-lisina e fissate con 2,5% di glutaraldeide in tampone cacodilato 0,1µM (pH 7,4) a temperatura ambiente per 20 min. Dopo la post-fissazione in OsO<sub>4</sub> 1% per 30 min, le cellule sono state disidratate prima in etanolo a concentrazioni crescenti (dal 50% al 100%) e, successivamente al punto critico della CO<sub>2</sub> ricoperte d'oro mediante un apparecchio della Balzers Union SCD 040. I campioni sono stati esaminati con un microscopio elettronico a scansione Cambridge 360.

## **Analisi morfometrica**

Gli eritrociti, processati come descritto sopra, sono stati esaminati con il microscopio elettronico a scansione (SEM). La forma alterata degli eritrociti è stata valutata contando al SEM in triplicato un minimo di 500 cellule (50 eritrociti per ciascun differente campo ad un ingrandimento di 3000x).

## **Valutazioni del contenuto di glutatione (GSH)**

La concentrazione del GSH ridotto è stata misurata in accordo con Hughes *et al.* (18). I livelli del glutatione ossidato (GSSG) negli estratti cellulari è stata determinata, come specificato precedentemente (19), in presenza della glutatione riduttasi per prevenire supplementari ossidazioni del GSH.

## Analisi citometrica

Per la citometria statica e a flusso sia gli eritrociti di controllo che quelli trattati sono stati fissati con paraformaldeide al 3,7% in PBS (pH 7,4) per 10 min a temperatura ambiente e, dopo lavaggio con lo stesso tampone, sono stati permeabilizzati con Triton X-100 (Sigma) in PBS per 5 min, lavati con PBS, e marcati con anticorpi monoclonali anti-spettrina (Sigma), anti-banda 3 (Sigma), anti  $\mu$ -calpaina attiva (Chemicon International, Temecula, CA, USA) o con l'anticorpo policlonale rabbit anti-catepsina E (CathE) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Dopo 30 min a 37 °C i campioni sono stati lavati e incubati per 30 min a 37 °C con anticorpi coniugati con FITC anti-mouse o anti-rabbit (Sigma). Campioni trattati solo con anticorpi secondari (mouse o rabbit) sono stati usati come controlli negativi. Per la determinazione della GA, cellule non fissate sono state marcate con l'anticorpo monoclonale anti-GA direttamente coniugato con FITC (Dako, Glostrup, Denmark) per 30 min a 4 °C. Un'appropriata immunoglobulina FITC-coniugata è stata usata come controllo negativo. Infine, dopo alcuni lavaggi, tutti i campioni sono stati montati con PBS-glicerolo (2:1) e osservati mediante un microscopio a fluorescenza (20) o analizzati con un citometro a flusso FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) dotato di un laser ad argon a 488 nm. Per ogni campione sono stati acquisiti almeno 20.000 eventi. I valori mediani degli istogrammi di fluorescenza ottenuti sono stati usati per fornire un'analisi semiquantitativa. I valori degli eritrociti non trattati sono stati considerati come 100% e i livelli delle proteine considerate nei diversi campioni sono stati riportati relativamente a questi.

## Determinazione della fosfatidilserina

I controlli freschi e i trattati sono stati incubati con AV-FITC (Eppendorf s.r.l., Milano, Italia) per 10 min al buio e a temperatura ambiente. Le cellule sono state immediatamente analizzate al citometro a flusso.

## Quantità intracellulare dei tioli ridotti

Per la determinazione del contenuto intracellulare di tioli ridotti, sia i controlli che le cellule trattate ( $5 \times 10^5$ ) sono stati incubati in una soluzione contenente 495  $\mu$ l di tampone Hanks (HBSS, pH 7.4) e 5  $\mu$ l di 5-clorometil-2,7-dicloro-diidro fluorescein diacetato (CM-H2DCFD, Molecular Probes, Leiden, The Netherlands). Dopo 15 min a 37 °C, i campioni sono stati analizzati al citometro. I valori mediani degli istogrammi di fluorescenza, sono stati usati per fornire un'analisi semiquantitativa.

## Attività delle caspasi

L'attività delle caspasi 2, 3, 8 e 9 è stata misurata usando specifici kit colorimetrici. Gli estratti totali (200  $\mu$ g di proteine) sono stati incubati con 200  $\mu$ M di del substrato specifico per ogni caspasi, coniugato con p-nitroanilidi (pNA). L'analisi si basa sulla determinazione spettrofotometrica dei cromofori pNA dopo il taglio dei specifici substrati. La lettura è stata eseguita a 450nm usando un lettore di piastre. Il confronto dell'assorbanza dei pNA dei campioni trattati con i controlli non trattati ha consentito di determinare l'incremento dell'attività delle caspasi (21).

## Attività della catepsina e della calpaina

L'attività della calpaina e della CathE è stata misurata usando specifici substrati fluorimetrici (Calbiochem, Bad Saden, Germany). Gli estratti citosolici (500µg di proteine) sono stati incubati con 100µM di ciascun substrato selettivo per 3 h. L'emissione di fluorescenza è stata quantificata attraverso l'uso di un fluorimetro a piastre (Packard Instrument Company, Meriden, CT). Il confronto delle emissioni di fluorescenza dei campioni trattati in rapporto con i controlli non trattati ha permesso di determinare l'incremento dell'attività delle suddette proteasi.

## Analisi statistica

I risultati ottenuti mediante citometria sono stati analizzati statisticamente usando il test parametrico di Kolmogorov-Smirnov (K/S) incluso nel programma Cell Quest. I valori riportati nel presente lavoro rappresentano le medie  $\pm$  la deviazione standard (SD) dei dati ottenuti da almeno quattro esperimenti indipendenti. Sono stati considerati significativi solo i valori di  $P < 0,01$ .

## Risultati

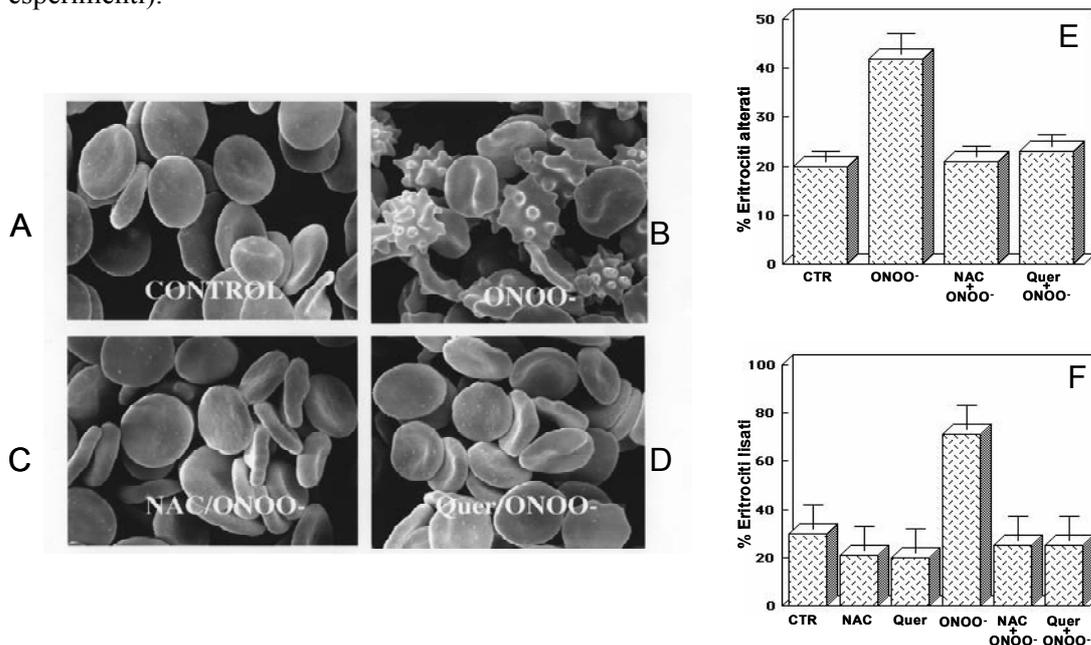
### Effetti ossidativi del perossinitrito

La valutazione dello stato ossidativo dell'emoglobina evidenziava come il trattamento con 50µM ONOO<sup>-</sup> produceva un incremento significativo (+26% $\pm$ 3% rispetto al controllo) della met-Hb. L'impiego di antiossidanti quali la NAC, un fornitore di tiolo, e la Quer, un flavonoide ubiquitariamente presente nella frutta e nei vegetali preveniva significativamente ( $p < 0,01$ ) la formazione di Met-Hb (100% oxy-Hb). Da notare che il perossinitrito alla concentrazione di 50µM è da considerarsi come una quantità compatibile con quelle raggiungibili in condizioni fisiologiche. Infatti, studi *in vivo* hanno dimostrato che macrofagi e neutrofili umani attivati possono generare più di 0,1-0,2nmol di ONOO<sup>-</sup>  $\times 10^6$  cell  $\text{min}^{-1}$  (22, 23), che corrisponde ad una produzione di µM di ONOO<sup>-</sup>.

### Effetti del perossinitrito sulla struttura dei globulo rosso

Il trattamento degli eritrociti con ONOO<sup>-</sup> induceva la formazione di una considerevole percentuale di acantociti ed echinociti e di alcune forme leptocitiche (Figura 1B; le cellule di controllo sono mostrate in Figura 1A). Le osservazioni al SEM di campioni di RBC, in cui il trattamento con ONOO<sup>-</sup> veniva preceduta da una pre-incubazione sia con NAC (Figura 1C) che con Quer (Figura 1D), indicavano una chiara protezione dal danno indotto da ONOO<sup>-</sup> da parte di questi antiossidanti. I risultati ottenuti dall'analisi morfometrica rivelavano: a) un significativo ( $p < 0,01$ ) incremento delle forme alterate in seguito a trattamento delle RBC con ONOO<sup>-</sup> (~40%); b) in accordo con le osservazioni suddette, entrambi gli antiossidanti esplicavano una significativa ( $p < 0,01$ ) azione protettiva (Figura 1E; i dati riportati sono le medie  $\pm$  SD di quattro diversi esperimenti). La successiva analisi della fragilità osmotica delle RBC evidenziava inoltre che, sebbene il trattamento con ONOO<sup>-</sup> non inducesse per se lisi cellulare, incrementava significativamente ( $p < 0,01$ ) la vulnerabilità delle RBC allo shock osmotico indotto da NaCl (90mM). Anche questo effetto era efficacemente contrastato sia dalla

NAC che dalla Quer (Figura 1F; i dati riportati sono le medie  $\pm$  SD di quattro diversi esperimenti).



**Figura 1. Caratteristiche ultrastrutturali e analisi morfometriche di eritrociti trattati con perossinitrito in presenza o in assenza di antiossidanti**

### Effetto del perossinitrito sui gruppi tiolici

È stato precedentemente dimostrato che uno stress ossidativo può indurre ossidazione dei gruppi tiolici di alcune proteine citoscheletriche responsabili del mantenimento della forma cellulare.

In considerazione del ruolo chiave giocato da queste proteine nei cambiamenti di forma delle RBC (24), è stato valutato, mediante citometria a flusso, il contenuto di tioli ridotti prima e dopo trattamento con ONOO<sup>-</sup>. Infatti, a seguito dell'esposizione a ONOO<sup>-</sup>, è stato rilevato un significativo decremento del GSH (dati non mostrati) associato ad un significativo ( $p < 0,01$ ) decremento dei tioli totali (Figura 2°; nella figura sono riportate le medie  $\pm$  SD delle mediane degli istogrammi di fluorescenza ottenuti in quattro diversi esperimenti). Inoltre, in parziale accordo con i dati precedentemente riportati, la NAC, ma non la Quer, era grado di contrastare significativamente gli effetti prodotti dal ONOO<sup>-</sup> sullo stato di ossidazione dei gruppi tiolici (Figura 2A).

L'analisi della spettina, la principale componente membrano-scheletrica delle RBC, mediante microscopia a fluorescenza dimostrava chiaramente che l'esposizione al ONOO<sup>-</sup> determina l'aggregazione e il patching di questa proteina (Figura 2C, comparare col controllo in Figura 2B). Questi cambiamenti erano contrastati completamente da NAC, (Figura 2D), ma solo parzialmente da Quer (Figura 2E).

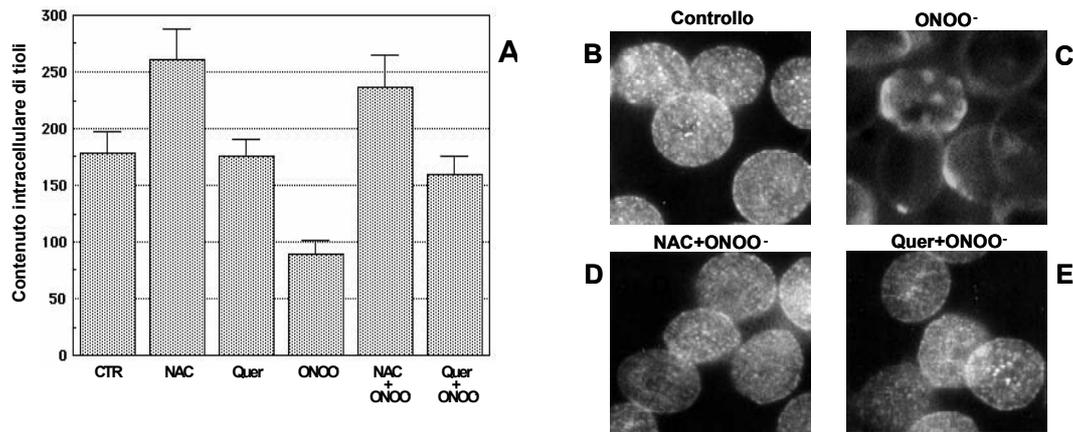


Figura 2. Omeostasi dei gruppi tiolici

### Effetti del perossinitrito sulle molecole di superficie

L'importanza della banda-3 come "molecola canale anionica" coinvolta nel mantenimento dell'omeostasi delle RBC e la sua stretta interazione con il raggruppamento membrano-scheletrico spettrina-actina, è nota da tempo (4). Per indagare eventuali effetti del perossinitrito su questa proteina sono state effettuate analisi qualitative, mediante immunofluorescenza, e quantitative, mediante citometria di flusso (Figura 3).

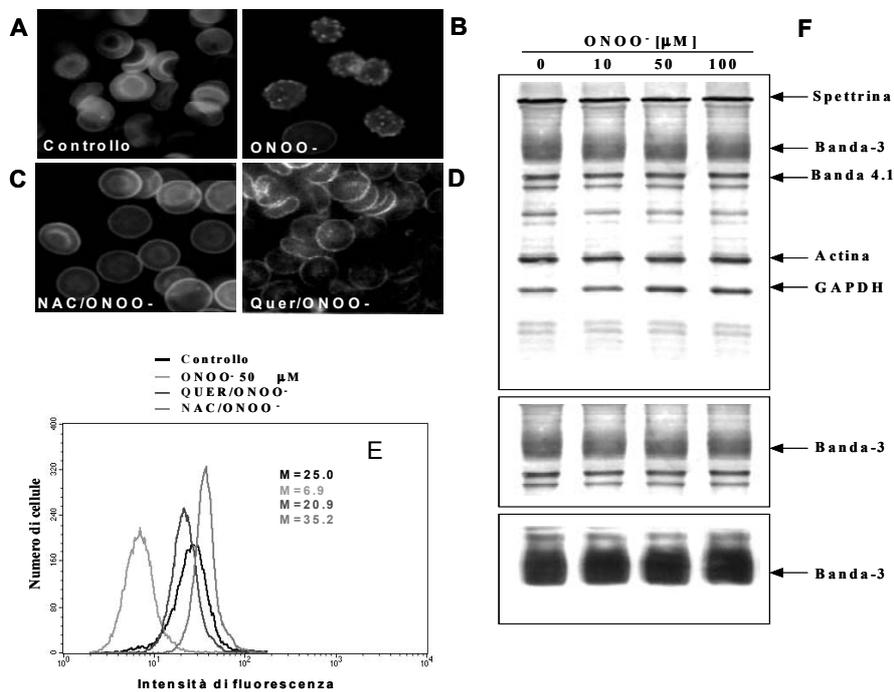


Figura 3. Valutazione della banda-3

Queste analisi hanno evidenziato un riarrangiamento e un patching della banda-3, che veniva a localizzarsi principalmente nelle *blebs* formate sulla superficie cellulare in seguito a trattamento con ONOO<sup>-</sup> (Figura 3B; le cellule di controllo sono mostrate in Figura 3A). La NAC si è rivelata molto efficace nel contrastare questi effetti (Figura 3C) mentre la Quer forniva una protezione soltanto parziale (Figura 3D). L'analisi quantitativa mediante citometria a flusso dimostrava inoltre una significativa ( $p < 0,01$ ) riduzione dell'espressione della banda-3, che è stata completamente prevenuta nel pre-trattamento con la NAC e solo parzialmente da quello con la Quer (Figura 3E; nella figura è riportato un esperimento rappresentativo e i numeri riportati rappresentano i valori medi degli istogrammi dell'intensità di fluorescenza). Tuttavia, l'analisi in Western blot non è stata in grado di evidenziare la riduzione del contenuto di banda-3 in seguito a trattamento con ONOO<sup>-</sup> (comparare Figura 3E con 3F). Questo potrebbe essere dovuto al fatto che la tecnica del Western blot non è sufficientemente sensibile da rivelare i cambiamenti quantitativi in una sub-popolazione di cellule. Un'altra possibile ipotesi per spiegare la discrepanza con i risultati ottenuti in citometria a flusso è che l'ossidazione della banda-3 ad opera del perossinitrito, possa aver reso la proteina non più riconoscibile dall'anticorpo alle condizioni non-riducenti nelle quali è stata condotta l'analisi citofluorimetrica. Inoltre, l'analisi della distribuzione (mediante microscopia a fluorescenza) e la valutazione dell'espressione (analisi semiquantitativa mediante citometria a flusso) di GA sulla superficie delle RBC indicavano chiaramente che: 1) l'esposizione al perossinitrito induceva un decremento significativo ( $p < 0,01$ ) dell'espressione di GA sulla superficie delle RBC, 2) che questo decremento era contrastato dal pre-trattamento con NAC e, in misura minore, con Quer (Figura 4A: viene mostrato un esperimento rappresentativo. I numeri indicano le mediane degli istogrammi di fluorescenza; Figura 4B: analisi statistica dei dati ottenuta mediante il test di K/S dei dati citofluorimetrici; Figura 4C: media dei dati ottenuti in quattro esperimenti indipendenti).

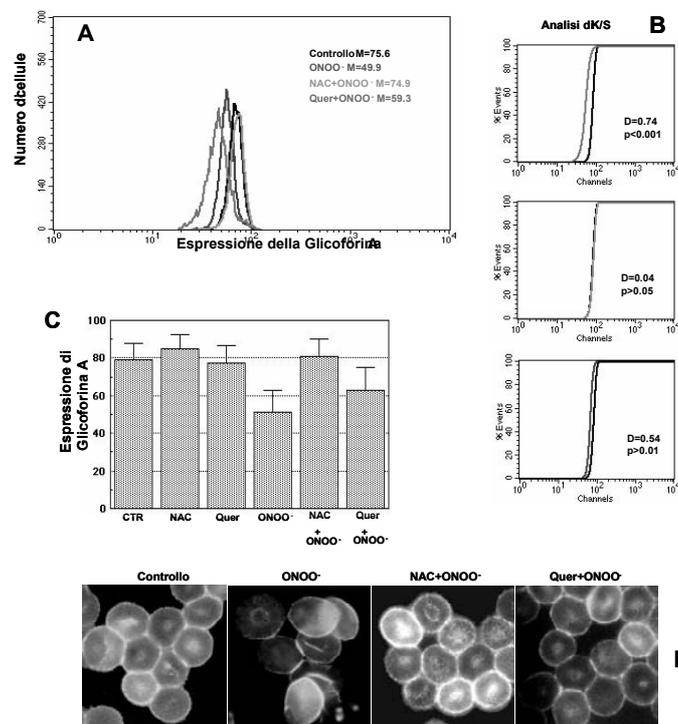


Figura 4. Analisi della Glicoforina A.

Da notare che la percentuale di RBC che mostrano un decremento dell'espressione di GA corrisponde a circa il 40%. Questo valore corrisponde alla percentuale di RBC che mostrava alterazioni morfologiche in seguito a trattamento con perossinitrito (vedi Figura 1). L'analisi di microscopia a fluorescenza mediante IVM indicava che ONOO<sup>-</sup> induceva una redistribuzione della GA sulla superficie cellulare e che i pre-trattamenti con NAC e Quer erano in grado di prevenire queste alterazioni (Figura 4D).

### Effetto del perossinitrito sull'attività della Catepsina E e della $\mu$ -Calpaina

La Figura 5 mostra la misura di due marcatori associati ai processi degenerativi dei RBC: la Catepsina E (CathE) e la  $\mu$ -calpaina (25,26).

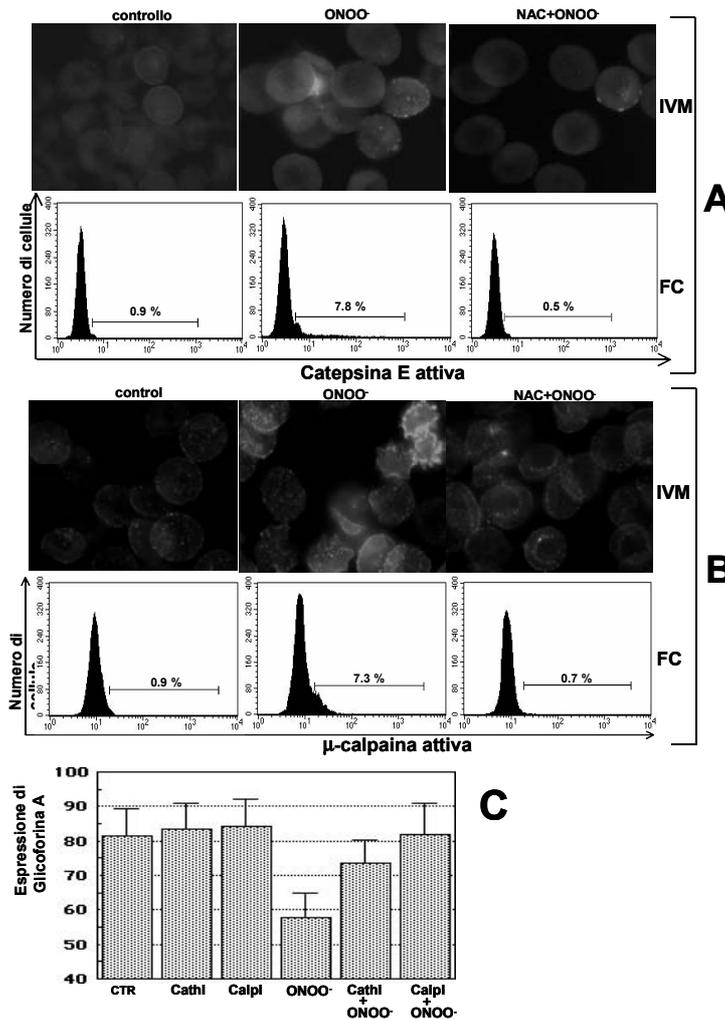


Figura 5. Analisi della catepsina E e della  $\mu$ -calpaina

Utilizzando anticorpi monoclonali in grado di riconoscere le forme attive di queste proteasi (vedere Materiali e Metodi) in RBC esposte ad ONOO<sup>-</sup>, si osservava un incremento della forma attiva di CathE (Figura 5A, pannello centrale; comparare col pannello di sinistra dove è

mostrato il controllo) in una significativa percentuale di cellule (~8%). Nella Figura 5, l'analisi qualitativa è stata effettuata mediante IVM e quantitative mediante citometria a flusso (FC) delle forme attive di Cath E (A) e  $\mu$ -calpaina (B).

È interessante notare che i pre-trattamenti con la NAC (Figura 5A: pannello di destra) e con la Quer (dati non mostrati) inibivano completamente l'attivazione della CathE. Risultati analoghi erano ottenuti per la  $\mu$ -calpaina, una proteasi calcio-dipendente capace di degradare la proteina banda-3 compromettendone la sua attività di pompa (27) (Figura 5B: pannello superiore) rispetto alle RBC di controllo (Figura 5B: pannello a sinistra). Inoltre, come per la CathE, una piccola percentuale (7.3%) di RBC trattate con perossinitrito presentava attivazione della  $\mu$ -calpaina (Figura 5B). Anche in questo caso, il pre-trattamento con NAC era in grado di prevenire completamente l'attivazione della  $\mu$ -calpaina (Figura 5B). Risultati simili sono stati ottenuti con Quer (dati non mostrati).

In considerazione del ruolo giocato da queste proteasi nell'invecchiamento e nella morte cellulare (28, 29), sono stati analizzati gli effetti degli inibitori selettivi di queste proteasi sulle alterazioni indotte dal perossinitrito. Il trattamento con CatI (inibitore della catepsina) o CalpI (inibitore della calpaina) prima dell'esposizione all'ONOO<sup>-</sup> era in grado di prevenire in modo significativo ( $p < 0,01$ ) la diminuzione di GA sulla superficie degli eritrociti trattati con ONOO<sup>-</sup> (Figura 5C; l'analisi quantitativa è stata effettuata mediante citometria a flusso. I valori riportati in ordinata sono le medie  $\pm$  SD dei valori mediani degli istogrammi di fluorescenza ottenuti da quattro esperimenti indipendenti).

### **Effetto del perossinitrito sulla esposizione della fosfatidilserina (PS)**

Sulla base dei risultati suddetti, si è deciso di valutare l'esternalizzazione della PS che costituisce un ulteriore parametro associato con la senescenza cellulare e marker marcatore precoce di l'apoptosi. È stato dimostrato infatti che la perdita di asimmetria della membrana plasmatica e l'esposizione di PS sono eventi associati con la morte cellulare in vari tipi di cellule (30) incluse le RBC (31, 32). Utilizzando l'affinità dell'annessina V (AV) per la PS, si osservava un significativo incremento delle cellule AV-positive (6-8%, Figura 6; nella figura i valori riportati nelle ordinate rappresentano le medie delle percentuali di cellule annessina V-positive ottenute in quattro diversi esperimenti) dopo esposizione a ONOO<sup>-</sup>. Tale fenomeno era significativamente contrastato sia dal pre-trattamento con Quer che con NAC (Figura 6A). Inoltre, in accordo con le evidenze di cui sopra (vedere Figure. 5A e 5B) e con l'ipotesi di un ruolo delle catepsine e delle calpaine nell'apoptosi (28, 33), abbiamo osservato una significativa ( $p < 0,01$ ) riduzione delle cellule AV-positive in presenza di CatI e CalpI (Figura 6B). Inoltre, utilizzando inibitori specifici delle caspasi, enzimi chiave coinvolti nella cascata apoptotica, emergeva che: gli inibitori della caspasi 2 (VDVAD), della caspasi 3 (DEVD) e, coerentemente, l'inibitore generico delle caspasi (ZVAD) riducevano significativamente ( $p < 0,01$ ) la percentuale di RBC AV-positive. Al contrario, il trattamento con IETD (inibitore della caspasi 8) non era efficace in tal senso (Figura 6C).

In fine, sulla base di dati di letteratura, che indicano un effetto apoptotico sugli eritrociti di un prolungato influsso di  $Ca^{2+}$  (34) e nel tentativo di chiarire il ruolo del calcio extracellulare nel nostro sistema sperimentale, sono state analizzate, in presenza di EGTA, sia l'esternalizzazione della PS che l'attivazione delle caspasi. Tuttavia, la chelazione del  $Ca^{2+}$  mediata dall'EGTA non influenzava in maniera significativa né l'esternalizzazione della PS indotta dal perossinitrito ( $\Delta\% = +2.6 \pm 0.8$  rispetto ai controlli non trattati) né la formazione di Met-Hb. Inoltre, in presenza di EGTA: 1) non si sono registrate significative variazioni dell'attività della caspasi 2 e 3 ( $\Delta\% < 10$ ), e 2) i livelli di espressione dei marcatori di senescenza

erano comparabili con quelli osservati somministrando ONOO<sup>-</sup> in assenza di EGTA (dati non mostrati).

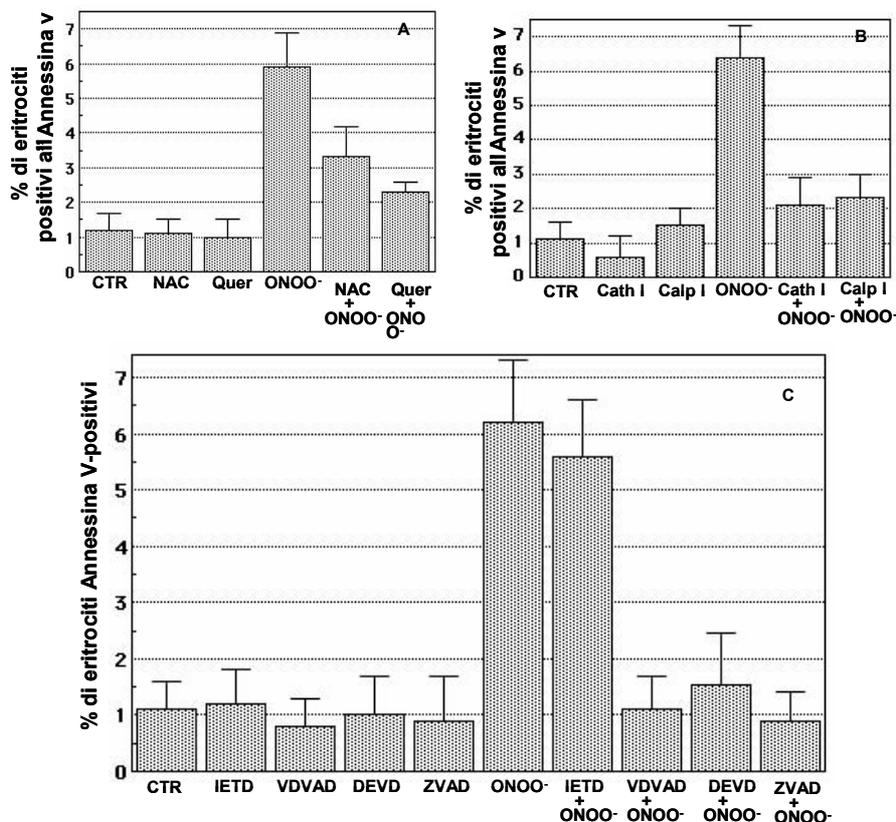


Figura 6. (A-C) Analisi citofluorimetrica dopo incubazione con annexina V-FITC per la rivelazione della PS sulla superficie degli eritrociti in diverse condizioni sperimentali

### Effetto del perossinitrito sull'attività delle proteasi

Alla luce dei dati suddetti, per identificare una possibile gerarchia nell'attivazione delle proteasi in seguito a trattamento con ONOO<sup>-</sup>, si è deciso di valutare l'attività di caspasi, catepsina e calpaina misurando la loro attività in presenza dei vari inibitori specifici.

Il trattamento con perossinitrito determinava l'attivazione delle caspasi 2 (Figura 7A) e della caspasi 3 (Figura 7B) mentre l'attività della caspasi 8 è risultata non rilevabile (dato non mostrato).

La specificità di questi risultati era confermata dall'impiego di inibitori specifici. La presenza della forma attiva della caspasi 3 dopo trattamento con ONOO<sup>-</sup> era anche dimostrata mediante analisi di Western blot.

La comparsa della forma matura della caspasi 3 (rappresentata da una banda di 20KDa a seguito della sua attivazione ed ottenuta mediante WB) è stata completamente prevenuta fornendo 50µM di ZVAD (Figura 7B, riquadro).

È interessante notare che l'inibitore delle caspasi ZVAD esercitava un significativo ( $p < 0,01$ ) effetto inibitorio sull'attivazione della catepsina e della calpaina (Figure. 7C e 7D, rispettivamente). I valori sono riportati come media  $\pm$  SD tra quattro diversi esperimenti).

Questo suggerisce chiaramente che le caspasi possano essere le prime proteasi ad attivarsi in seguito a trattamento con ONOO<sup>-</sup> determinando la successiva attivazione della calpaina e della catepsina.

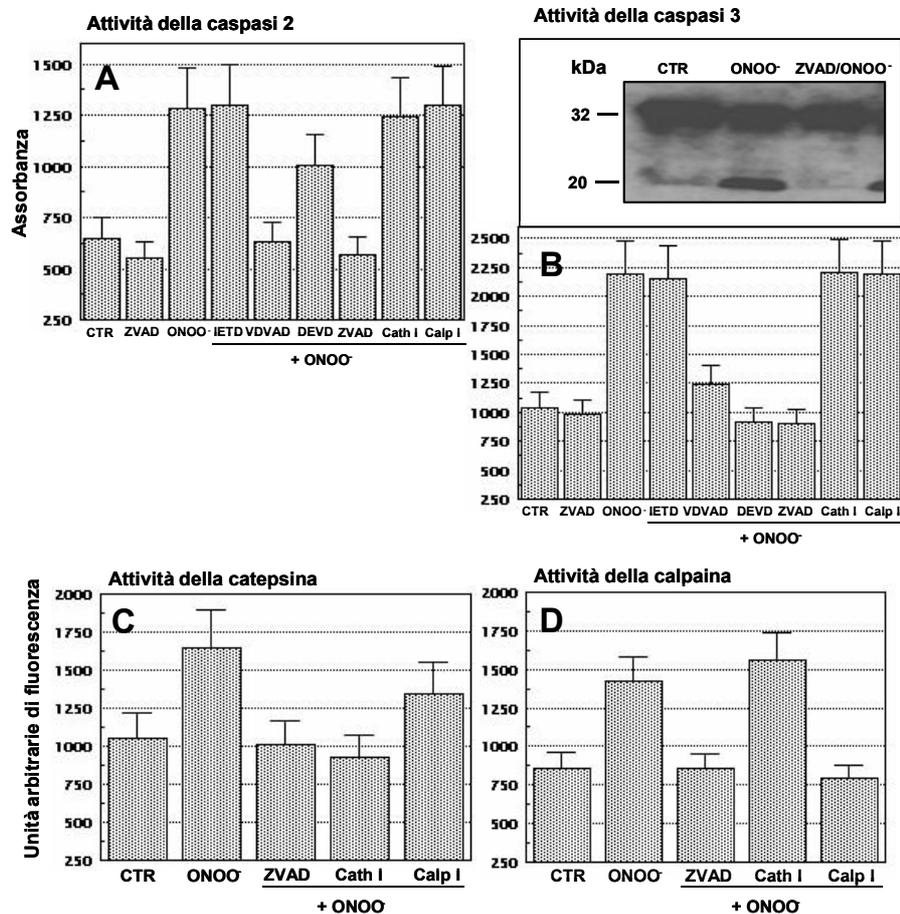


Figura 7. Effetto del perossinitrito sull'attività delle proteasi

Alla luce di questi risultati, è stato studiato il ruolo delle caspasi nell'invecchiamento e nella morte delle RBC con un set di esperimenti specifici, mirati a valutare gli effetti degli inibitori delle caspasi sui marcatori della senescenza delle RBC (Met-Hb, GA e banda-3). Come mostrato in Figura 8 (i dati riportati sono le medie  $\pm$  SD di quattro diversi esperimenti), la formazione della Met-Hb indotta dal ONOO<sup>-</sup> non era prevenuta in modo significativo dalla presenza degli inibitori delle proteasi. Per contro, gli inibitori della caspasi 2 (VDAVD), della caspasi 3 (DEVD) e l'inibitore generico delle caspasi (ZVAD) prevenivano in maniera significativa ( $p < 0,01$ ) la riduzione di GA sulla superficie delle RBC indotta dal trattamento con il perossinitrito (Figura 8B) (i dati riportati sono le medie  $\pm$  SD di quattro diversi esperimenti). I risultati ottenuti non mostravano alcun significativo effetto degli inibitori delle caspasi sulle alterazioni della banda-3 indotte dal ONOO<sup>-</sup>, precedentemente descritte (vedi Figura 3).

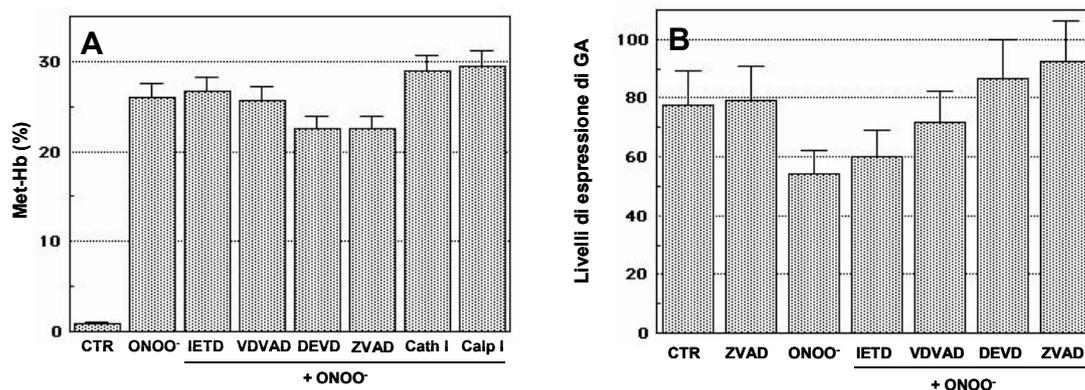


Figura 8. Inibitori delle proteasi e senescenza.

In fine, per verificare la reversibilità degli effetti indotti dal ONOO<sup>-</sup>, sono stati eseguiti esperimenti di recupero incubando le RBC in presenza di glucosio (20mM) dopo l'esposizione al perossinitrito. In accordo con quanto noto circa la capacità di legame del Met-Hb con la banda-3 (35), sono stati osservati una significativa riduzione della formazione di Met-Hb (-50%) indotta dal ONOO<sup>-</sup> e un conseguente significativo recupero del *pattern* di espressione della banda-3 ai livelli osservati in eritrociti non trattati.

trattati. Per contro, l'esternalizzazione della PS non variava dopo incubazione degli eritrociti trattati in presenza di glucosio essendo la percentuale di cellule AV-positive (7.2%) non significativamente dissimile a quella trovata negli eritrociti trattati con ONOO<sup>-</sup> (compara con i risultati mostrati in Fig.ura 6).

## Discussione

Una correlazione tra danno ossidativo e perdita dell'asimmetria della fosfatidilserina è stata riscontrata negli eritrociti provenienti da pazienti affetti da patologie ematiche quali l'anemia falciforme, la talassemia, la deficienza della glucosio-6 fosfato deidrogenasi e anche nel diabete (32, 36-39). L'esternalizzazione di PS, che rappresenta un fenomeno tipico del processo apoptotico, contribuisce alla riduzione dell'emivita degli eritrociti difettosi (36, 40-44) e può alterare alcune funzioni del globulo rosso quali la coagulazione e l'aggregabilità (45, 56). D'altra parte, la produzione eccessiva di specie reattive dell'ossigeno è stata associata all'asimmetria di PS ed è considerata di grande importanza nel determinare il destino della cellula: senescenza o morte (3). Il perossinitrito, generato dalla reazione tra anione superossido e ossido nitrico, è stato riconosciuto come specie chiave pro-ossidante coinvolta nei meccanismi patogenici che sottendono diverse malattie (47), incluse alcune malattie degenerative e respiratorie (14, 48). I dati qui riportati sono stati ottenuti su un sistema sperimentale *in vitro* che mima lo squilibrio ossidativo riscontrabile *in vivo* nel corso di alcune patologie. Questo sistema ci ha permesso di osservare che dopo stress ossidativo con ONOO<sup>-</sup> circa il 40% della popolazione eritrocitaria presentava caratteristiche che sono tipiche delle cellule senescenti e che una piccola percentuale di queste (~7%) mostrava alterazioni tipiche dell'apoptosi come l'esternalizzazione di fosfatidilserina e l'attivazione delle caspasi 2 e 3.

## Squilibrio ossidativo e senescenza

Il perossinitrito è una molecola molto reattiva ma con una emivita breve. Le concentrazioni di ossido nitrico e di superossido, i quali reagendo formano il perossinitrito, in condizioni normali sono dell'ordine dei nM ma possono, in condizioni patologiche, raggiungere concentrazioni dell'ordine dei  $\mu\text{M}$  (49, 50). Il perossinitrito è responsabile dell'ossidazione di alcuni residui aminoacidici, dell'incremento del contenuto dei carbonili, della frammentazione delle proteine, della formazione di -SNO (47, 51-54), nonché della fosforilazione e nitratura di alcune proteine di membrana degli eritrociti (54). In questo scenario, abbiamo quindi ipotizzato che le alterazioni a livello proteico indotte da  $\text{ONOO}^-$  possano determinare una conseguente alterazione della superficie cellulare e del sottostante citoscheletro. Inoltre cambiamenti in senso ossidativo delle proteine possono renderle più suscettibili all'azione delle proteasi endogene attivate dallo stesso trattamento con perossinitrito. I cambiamenti indotti sugli eritrociti dall' $\text{ONOO}^-$ , considerato come paradigmatico di uno squilibrio ossidativo, possono indurre dei fenomeni di senescenza precoce, come dimostrato anche dalla comparsa di specifici markers di senescenza. Una serie di cambiamenti sia morfologici che molecolari (ossidazione della Hb, alterazioni strutturali, cambiamenti della spettina citoscheletrica, alterazioni delle molecole di superficie) tipiche delle RBC senescenti, sono infatti stati osservati in una percentuale significativa di cellule trattate con  $\text{ONOO}^-$  (40%). La presenza di farmaci antiossidanti (così come i trattamenti con gli inibitori specifici delle proteasi) sembrerebbe inoltre dimostrare che il danno ossidativo indotto da  $\text{ONOO}^-$  (16) è mediato specificamente dall'attivazione di queste proteasi (caspasi, catepsina e calpaina).

La funzionalità della banda-3 è fortemente dipendente dall'integrità delle proteine citoscheletriche (57) che, contenendo un considerevole numero di gruppi tiolici, risultano particolarmente vulnerabili all'esposizione al perossinitrito. Infatti, questa molecola canale è apparsa diminuita e fortemente alterata nella sua distribuzione in conseguenza all'esposizione al perossinitrito. In accordo con quanto detto, tali alterazioni erano significativamente prevenute dalla NAC, diretto fornitore di gruppi tiolici.

I nostri risultati indicano quindi che la NAC, agendo come fornitore di tioli ridotti, esercita una potente azione protettiva contro le alterazioni redox indotte da  $\text{ONOO}^-$ , almeno in termini di mantenimento della forma cellulare e della corretta espressione di alcune molecole di superficie delle RBC, la cui diminuzione è associata a fenomeni di senescenza (6, 58-61). Questo dato potrebbe rivestire una certa importanza anche in considerazione dell'ampio impiego della NAC nella pratica clinica, ad esempio nel trattamento di alcune malattie respiratorie croniche che spesso si associano a condizioni di sbilanciamento ossido-riduttivo (14). Infine, i nostri risultati indicano che anche il composto polifenolico Quer era in grado di agire da antagonista degli effetti indotti dal perossinitrito, anche se in misura minore rispetto alla NAC. Questo è in accordo con altri dati pubblicati che descrivono le proprietà antiossidanti manifestate da questa classe di flavonoidi (11, 62, 63).

## Meccanismi di morte cellulare

L'alterazione delle caspasi e l'esternalizzazione della PS in una piccola, ma significativa percentuale di cellule (~7%) individuano una sorta di fenotipo "apoptotico" negli eritrociti trattati con  $\text{ONOO}^-$ . L'esternalizzazione della PS è infatti l'evento più tipico dell'apoptosi di cellule nucleate e comporta la rimozione dal circolo degli eritrociti che la esprimono sulla loro superficie (45). La percentuale di RBC positive all'AV dopo esposizione a perossinitrito (~7%) è comparabile con quella osservata *in vivo* in particolari patologie ematiche come ad esempio l'anemia falciforme (~7-9%) e anche non ematiche come il diabete (32, 36-38, 40, 42-44). È

importante notare che alcune di queste patologie (l'anemia di Fanconi, l'Atassia Telangiectasia e la Sindrome di Werner) sono state associate proprio a squilibri ossido-riduttivi (64) e che gli eritrociti di questi pazienti sono stati oggetto di numerosi studi e la loro analisi è stata proposta come possibile strumento diagnostico e/o prognostico in queste malattie (65-67). In questo contesto, i nostri risultati potrebbero suggerire un utile modello per l'approfondimento della patogenesi di queste e altre malattie caratterizzate da alterazioni redox.

Riguardo all'apoptosi, gli eritrociti maturi, in quanto cellule anucleate, possono rappresentare un modello semplificato per lo studio dei *pathways* biochimici che operano in assenza di mitocondri e di altri organelli. L'assenza di un nucleo, di un apparato di sintesi proteica e di sistemi di membrane interne non sembrerebbe quindi precludere il concretizzarsi di una forma di PCD attiva (68, 69). Recentemente sono emerse nuove evidenze di apoptosi su RBC. Tuttavia, l'apoptosi era indotta in condizioni sperimentali profondamente diverse da quelle presentate in questo lavoro. Infatti influssi di  $Ca^{2+}$  possono indurre una massiva apoptosi (più del 80% dopo 6 giorni) in RBC attraverso l'attivazione di proteasi diverse dalle caspasi (34, 70) che, se pur presenti abbondantemente nell'eritrocita non vengono attivate dal  $Ca^{2+}$  (10, 71). Inoltre, è stato osservato che la  $\mu$ -calpaina, una cisteina proteasi calcio-dipendente normalmente localizzata nel citosol delle RBC come pro-enzima inattivo, traslochi sulla membrana dove subisce un'attivazione autoproteolitica (10). Un ruolo chiave per la  $\mu$ -calpaina è stato perciò proposto per la cosiddetta eritro-apoptosi indotta da flusso di calcio (68). I nostri risultati aggiungono nuove evidenze a questo complesso scenario suggerendo che, accanto al ruolo della  $\mu$ -calpaina che potrebbe verosimilmente essere coinvolta nel caso del calcio, altre proteasi, possono invece partecipare attivamente alla morte delle RBC indotta ad esempio da stress ossidativo: la catepsina E e le caspasi 2 e 3. Al contrario, almeno nelle nostre condizioni sperimentali, la caspasi 8 non sembra essere coinvolta. L'attivazione delle caspasi può coinvolgere le cisteine chiave presenti nel loro sito attivo, residui verso cui il perossinitrito è particolarmente reattivo (~1000-3000 volte più reattivo del perossido d'idrogeno) (16). In ogni caso, considerando la scarsa e contraddittoria letteratura presente su questo argomento, i nostri dati forniscono alcune informazioni originali. Primo, che gli inibitori specifici delle caspasi (DEVD, VDAV e ZVAD) sono efficaci nella protezione delle RBC dalle alterazioni indotte dal perossinitrito. Questo è solo parzialmente in accordo con i risultati precedentemente ottenuti utilizzando come stimolo apoptotico il flusso di calcio, i quali attribuivano un ruolo predominante alla  $\mu$ -calpaina (34). Secondo, per la prima volta si propone la partecipazione della catepsina E nelle alterazioni redox -indotte negli eritrociti. I nostri dati sono in accordo con i risultati ottenuti in cellule nucleate (33), i quali descrivono due distinti *pathways* apoptotici: caspasi- e non-caspasi- catepsina-dipendente. Sorprendentemente, entrambi i *pathways* sembrano essere attivati (prima le caspasi) nell'apoptosi delle RBC indotta dal perossinitrito. Terzo, è stato recentemente mostrato che le caspasi vengono attivate durante la senescenza delle RBC e che ciò porta alla distruzione dell'interazione banda-3-citoscheletro che è evento cruciale nel mantenimento della forma e della funzione delle RBC (72). Questo dato è in accordo con i risultati presentati in questo lavoro e suggerisce come l'attività delle caspasi possa anche svolgere un ruolo nel regolare il "destino fisiologico" delle RBC senescenti.

I *pathways* biochimici coinvolti nell'apoptosi delle RBC sono ancora materia di dibattito. Soprattutto, non è chiaro se differenti stimoli (ingresso di  $Ca^{2+}$ , esaurimento dell'energia, ceramide, specie ossidanti, ecc.) attivino differenti *pathways* apoptotici. Almeno nel caso dell'apoptosi dipendente dal perossinitrito, i nostri risultati sembrerebbero dimostrare una precisa gerarchia nell'attivazione delle diverse proteasi suggerendo le caspasi come primi attori. Inoltre, i nostri dati ottenuti con gli inibitori delle proteasi indicano ulteriormente un legame tra la senescenza e l'apoptosi nelle RBC (72) anche dal punto di vista biochimico come anche illustrato nello Schema proposto in Figura 9.

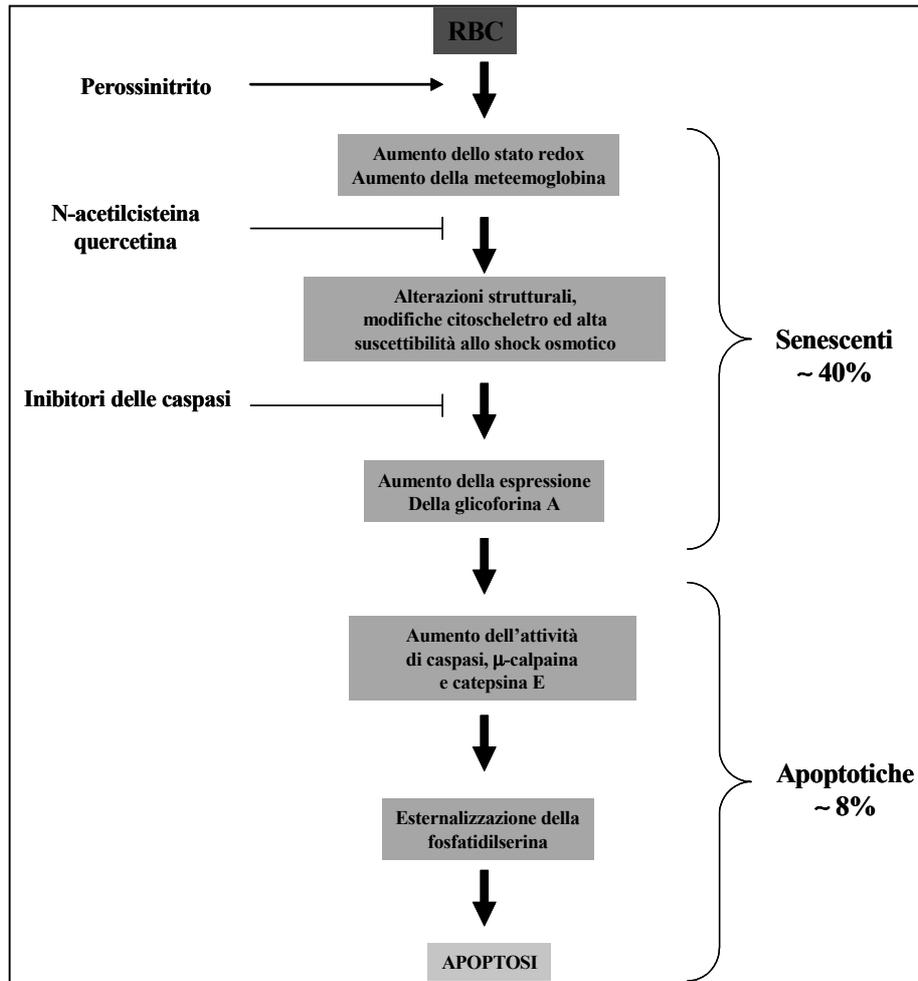


Figura 9. Possibile legame tra senescenza e apoptosi indotte dal perossinitrito nei RBC

## Bibliografia

1. Kiefer CR, Snyder LM. Oxidation and erythrocyte senescence. *Curr Opin Hematol* 2000;7:113-6.
2. Ohnishi ST, Ohnishi T. Membrane abnormalities in sickle cell disease and in other red blood cell disorders. In: Ohnishi ST, Ohnishi T (Ed.) *Membrane-linked diseases*, Boca Raton, Ann Arbor, USA: Press CRC;1994; p 1-268.
3. Manno S, Takakuw, Y, Mohandas N. Identification of a functional role for lipid asymmetry in biological membranes: Phosphatidylserine-skeletal protein interactions modulate membrane stability. *Proc Nat. Acad Sc. USA* 99,1943-48.
4. Poole J. Red cell antigens on band 3 and glycophorin A. *Blood Rev* 2000;4:31-43.
5. Neri M, Geido E, Filiberti R, Orecchia R, Di Vinci A, Cafferata M, Tassara E, Puntoni R, Giaretti W. Analysis of erythrocyte glycophorin-A variants by flow cytometry in lung disease patients detects the effect of tobacco smoke. *Anal Cell Pathol* 2000;21:35-40.

6. Straface E, Matarrese P, Gambardella L, Forte S, Carlone S, Libianchi E, Schmid G, Malorni W. N-Acetylcysteine counteracts erythrocyte alterations occurring in chronic obstructive pulmonary disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;279:552-56.
7. Boas FE, Forman L, Beutler E. Phosphatidylserine exposure and red cell viability in red cell aging and in hemolytic anemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:3077-81.
8. Piagnerelli M, Boudjeltia KZ, Brohee D, Piro P, Carlier E, Vincent JL, Lejeune P, Vanhaeverbeek M. Alterations of red blood cell shape and sialic acid membrane content in septic patients. *Crit Care Med* 2003;31:2156-62.
9. Yasin Z, Witting S, Palascak MB, Joiner CH, Rucknagel DL, Franco RS. Phosphatidylserine externalization in sickle red blood cells: associations with cell age, density, and hemoglobin F. *Blood* 2003;102, 365-70.
10. Berg CP, Engels IH, Rothbart A, Lauber K, Renz A, Schlosser SF, Schulze-Osthoff K, Wesselborg S. Human mature red blood cells express caspase-3 and caspase-8, but are devoid of mitochondrial regulators of apoptosis. *Cell Death Differ* 2001;8:1197-06.
11. Bilto YY, Abdalla SS. Effects of selected flavonoids on deformability, osmotic fragility and aggregation of human erythrocytes. *Clin Hemorheol Microcirc* 1998;18:165-73.
12. Denicola A, Souza JM, Radi R. Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:3566-71.
13. Romero N, Denicola A, Souza JM, Radi R Diffusion of peroxynitrite in the presence of carbon dioxide. *Arch Biochem Biophys* 1999;368:23-30.
14. Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease. *New Engl J Med* 2000;43:269-80.
15. Mesquita R, Picarra B, Saldanha C, Martins e Silva J. Nitric oxide effects in human erythrocytes structural and functional properties an *in vitro* study. *Clin Hemorheol Microcirc* 2000;27:137-47.
16. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* 1991;266:4244-50.
17. Winterbourn CC Oxidative reactions of hemoglobin. *Methods Enzymol* 1990;186:265-72.
18. Hughes HM, Powell GM, Snodin DJ, Daniel JW, Crawford A, Sanders JK, Curtis CG Glutathione-dependent dechlorination of 1,6-dichloro-1,6-dideoxyfructose. *Biochem J* 1989;259:537-43.
19. Piccinini G, Minetti G, Balduini C, Brovelli A Oxidation state of glutathione and membrane proteins in human red cells of different age. *Mech Ageing Dev* 1985;78:15-26.
20. Parlato S, Giammarioli AM, Logozzi M, Lozupone F, Matarrese P, Luciani F, Falchi M, Malorni W, Fais S CD95 (APO-1/Fas) linkage to the actin cytoskeleton through ezrin in human T lymphocytes: a novel regulatory mechanism of the CD95 apoptotic pathway. *EMBO J* 2000;19: 5123-34.
21. Casciola-Rosen L, Nicholson DW, Chong T, Rowan KR, Thornberry NA, Miller D, Rosen A. Apopain/CPP32 cleaves proteins that are essential for cellular repair: a fundamental principle of apoptotic death. *J Exp Med* 1997;183:1957-64.
22. Ischiropoulos H, Zhu L, Beckman JS Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 1992;298:446-51.
23. Carreras MC, Pargament GA, Catz SD, Poderoso JJ, Boveris A Kinetics of nitric oxide and hydrogen peroxide production and formation of peroxynitrite during the respiratory burst of human neutrophils. *FEBS Lett* 1994;34:65-68.
24. Caprari, P., Bozzi, A., Malorni, W., Bottini, A., Iosi, F., Santini, M. T., and Salvati, A. M. (1995) Junctional sites of erythrocyte skeletal proteins are specific targets of tert-butylhydroperoxide oxidative damage. *Chem Biol Interact* 94, 243-48.

25. Reliene R, Mariani M, Zanella A, Reinhart WH, Ribeiro ML, Del Giudice EM, Perrotta S, Iolascon A, Eber S, Lutz HU Splenectomy prolongs *in vivo* survival of erythrocytes differently in spectrin/ankyrin- and band 3-deficient hereditary spherocytosis. *Blood* 2002;100:2208-15.
26. Yamamoto K, Yamada M, Kato, Y. Age-related and phenylhydrazine-induced activation of the membrane-associated cathepsin E in human erythrocytes. *J Biochem* 1989;105:114-19.
27. Glaser T, Schwarz-Benmeir N, Barnoy S, Barak S, Eshhar Z, Kosower NS. Calpain (Ca<sup>2+</sup>-dependent thiol protease) in erythrocytes of young and old individuals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:7879-83.
28. Matarrese P, Di Biase L, Santodonato L, Straface E, Mecchia M, Ascione B, Parmiani G, Belardelli F, Ferrantini M, Malorni W. Type I interferon gene transfer sensitizes melanoma cells to apoptosis via a target activity on mitochondrial function. *Am J Pathol* 2002;160:1507-20.
29. Schmitz I, Walczak H, Krammer PH, Peter ME Differences between CD95 type I and II cells detected with the CD95 ligand. *Cell Death Differ* 1999;6:821-22.
30. Fadok VA, De Cathelineau A, Daleke DL, Henson PM, Bratton DL Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages. *J Biol Chem* 2001;276:1071-77.
31. Manodori A, Kuypers FA. Altered red cell turnover in diabetic mice. *J Lab Clin Med* 2002;140:161-5.
32. Kuypers FA Phospholipid asymmetry in health and disease. *Curr Opin Hematol* 1998;5:122-131.
33. Johnson DE. Noncaspase proteases in apoptosis. *Leukemia* 1998 14 :1695-03.
34. Bratosin D, Estaquier J, Petit F, Arnoult D, Quatannens B, Tissier JP, Slomianny C, Sartiaux C, Alonso C, Huart JJ, Montreuil J, Ameisen JC. Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria. *Cell Death Differ* 2001;8:1143-56.
35. Walder JA, Chatterjee R, Steck TL, Low PS, Musso GF, Kaiser ET, Rogers PH, Arnone A. The interaction of hemoglobin with the cytoplasmic domain of band 3 of the human erythrocyte membrane. *J Biol Chem* 1984;259:10238-46.
36. De Jong K, Emerson RK, Butler J, Bastacky J, Mohandas N, Kuypers FA Short survival of phosphatidylserine-exposing red blood cells in murine sickle cell anemia. *Blood* 2001;98:1577-84.
37. Kean LS, Brown LE, Nichols JW, Mohandas N, Archer DR, Hsu LL. Comparison of mechanisms of anemia in mice with sickle cell disease and beta-thalassemia: peripheral destruction, ineffective erythropoiesis, and phospholipid scramblase-mediated phosphatidylserine exposure. *Exp Hematol* 2002;30:394-02.
38. Lang KS, Roll B, Myssina S, Schittenhelm M, Scheel-Walter HG, Kanz L, Fritz J, Lang F, Huber SM., Wieder T. Enhanced erythrocyte apoptosis in sickle cell anemia, thalassemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Cell Physiol Biochem* 2002;12:365-72.
39. Schrier SL. Pathophysiology of thalassemia. *Curr Opin Hematol* 2002;9:123-26.
40. Connor J, Pak CC, Schroit AJ. Exposure of phosphatidylserine in the outer leaflet of human red blood cells. Relationship to cell density, cell age, and clearance by mononuclear cells. *J Biol Chem* 1994;269:2399-04.
41. Kuypers FA, Lewis RA, Hua M, Schott MA, Discher D, Ernst JD, Lubin BH. Detection of altered membrane phospholipid asymmetry in subpopulations of human red blood cells using fluorescently labeled annexin V. *Blood* 1996;87:1179-87.
42. Phumala N, Porasuphatana S, Unchern S, Pootrakul P, Fucharoen S, Chantharaksri U. Hemin: a possible cause of oxidative stress in blood circulation of beta-thalassemia/hemoglobin E disease. *Free Radic Res* 2002;37:129-35.

43. Ristoff E, Larsson A. Oxidative stress in inborn errors of metabolism: lessons from glutathione deficiency. *J Inherit Metab Dis* 2002;25:223-26.
44. Steinberg MH, Brugnara C. Pathophysiological-based approaches to treatment of sickle cell disease. *Annu Rev Med* 2003;54:89-12.
45. Schlegel RA, Williamson P. Phosphatidylserine, a death knell. *Cell Death Differ* 2001;8:551-63.
46. Wood BL, Gibson DF, Tait JF. Increased erythrocyte phosphatidylserine exposure in sickle cell disease: flow-cytometric measurement and clinical associations. *Blood* 1996;88:1873-80.
47. Galli F, Rossi R, Di Simplicio P, Floridi A, Canestrari F. Protein thiols and glutathione influence the nitric oxide-dependent regulation of the red blood cell metabolism. *Nitric Oxide* 2002;6:186-99.
48. Ichinose M, Sugiura H, Yamagata S, Koarai A, Shirato K. Increase in reactive nitrogen species production in Chronic Obstructive Pulmonary disease Airways. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:701-06.
49. Groves JD, Parker MD, Askin D, Falson P, le Maire M, Tanner MJ. Heterologous expression of the red-cell anion exchanger (band 3; AE1). *Biochem Soc Trans* 1999;27:917-23.
50. Patel S, Robb-Gaspers LD, Stellato KA, Shon M, Thomas AP. Coordination of calcium signalling by endothelial-derived nitric oxide in the intact liver. *Nat Cell Biol* 1999;1:467-71.
51. Ischiropoulos H, al-Mehdi AB. Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. *FEBS Lett* 1995;364:279-82.
52. Grzelak A, Mazur J, Bartosz G. Peroxynitrite activates  $K^+$ - $Cl^-$  cotransport in human erythrocytes. *Cell Biol Int* 2001;25:1163-65.
53. Koppenol S, Tsao FH, Yu H, Zografis G. The interaction of lung annexin I with phospholipid monolayers at the air/water interface. *Biochim Biophys Acta* 1998;1369:221-32.
54. Pryor WA, Squadrito GL. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol* 1995;268:699-22.
55. Mallozzi C, Di Stasi AM, Minetti M. Peroxynitrite modulates tyrosine-dependent signal transduction *pathway* of human erythrocyte band 3. *FASEB J* 1997;11:1281-90.
56. Piacentini M, Farrace MG, Piredda L, Matarrese P, Ciccocanti F, Falasca L, Rodolfo C, Giammarioli AM, Verderio E, Griffin M, Malorni W. Transglutaminase overexpression sensitizes neuronal cell lines to apoptosis by increasing mitochondrial membrane potential and cellular oxidative stress. *J Neurochem* 200;81:1061-72.
57. Von Ruckmann B, Jons T, Dolle F, Drenckhahn D, Schubert D. Cytoskeleton-membrane connections in the human erythrocyte membrane: band 4.1 binds to tetrameric band 3 protein. *Biochim Biophys Acta* 1997;1325:226-34.
58. Morrot G, Cribier S, Devaux PF, Geldwerth D, Davoust J, Bureau JF, Fellmann P, Herve P, Frilley B. Asymmetric lateral mobility of phospholipids in the human erythrocyte membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:6863-67.
59. McEvoy L, Williamson P, Schlegel RA. Membrane phospholipid asymmetry as a determinant of erythrocyte recognition by macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:3311-15.
60. Straface E, Rivabene R, Masella R, Santulli M, Paganelli R, Malorni W. Related Structural changes of the erythrocyte as a marker of non-insulin-dependent diabetes: protective effects of N-acetylcysteine. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290:1393-98.
61. Tanaka KI, Ohnishi S. Heterogeneity in the fluidity of intact erythrocyte membrane and its homogenization upon hemolysis. *Biochim Biophys Acta* 1976;426:218-31.
62. Comporti M, Signorini C, Buonocore G, Ciccoli L. Iron release, oxidative stress and erythrocyte ageing. *Free Radic Biol Med* 2002;32:568-76.

63. Fiorani M, De Sanctis R, De Bellis R, Dacha M. Intracellular flavonoids as electron donors for extracellular ferricyanide reduction in human erythrocytes. *Free Radic Biol Med* 2002;32:64-62.
64. Pagano G, Korkina LG, Brunk UT, Chessa L, Degan P, del Principe D, Kelly FJ, Malorni W, Pallardo F, Pasquier C, Scovassi I, Zatterale A, Franceschi C. Congenital disorders sharing oxidative stress and cancer proneness as phenotypic hallmarks: prospects for joint research in pharmacology. *Med Hypotheses* 1998;51:253-66.
65. Kyoizumi S, Kusunoki Y, Seyama T, Hatamochi A, Goto M. *In vivo* somatic mutations in Werner's syndrome. *Human Genet* 1998;103:405-10.
66. Grant SG, Reeger W, Wenger SL. Diagnosis of ataxia telangiectasia with the glycophorin A somatic mutation assay. *Genet Test* 1997;1:261-67.
67. Malorni W, Straface E, Pagano G, Monti D, Zatterale A, Del Principe D, Deeva IB, Franceschi C, Masella R, Korkina LG. Cytoskeleton alterations of erythrocytes from patients with Fanconi's anemia. *FEBS Lett* 2000;468:125-28.
68. Daugas E, Cande C, Kroemer G. Erythrocytes: death of a mummy. *Cell Death Differ* 2001;8:1131-33.
69. Mandal D, Moitra PK, Saha S, Basu J. Caspase 3 regulates phosphatidylserine externalization and phagocytosis of oxidatively stressed erythrocytes. *FEBS Lett* 2002;513:184-88.
70. Lang F, Lang KS, Wieder T, Myssina S, Birka C, Lang PA, Kaiser S, Kempe D, Duranton C, Huber SM. Cation channels, cell volume and the death of an erythrocyte. *Pflugers Arch* 2003;447:121-25.
71. Bratosin D, Estaquier J, Ameisen JC, Montreuil J. Molecular and cellular mechanisms of erythrocyte programmed cell death: impact on blood transfusion. *Vox Sang* 2002;83:307-10.
72. Mandal D, Baudin-Creuzat V, Bhattacharyya A, Pathak S, Delaunay J, Kundu M, Basu J. Caspase 3-mediated proteolysis of the N-terminal cytoplasmic domain of the human erythroid anion exchanger 1 (band 3). *J Biol Chem* 2003;278:52551-58.

# VALUTAZIONE DELLO STRESS OSSIDATIVO NEGLI ANIMALI DA REDDITO

Gianfranco Brambilla, Stefania De Filippis  
Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria

## Introduzione

Da un punto di vista metodologico, la misurazione dello stress ossidativo negli animali da reddito si inserisce nella tematica di attualità della valutazione dello stato di benessere animale. In questo caso, tale valutazione viene condotta in un contesto biochimico-clinico, al fine di verificare la possibilità che l'animale riesca a mantenere una sostanziale omeostasi, a fronte degli stimoli ambientali e zootecnici cui deve fare fronte, stimoli che sono fundamentalmente indirizzati verso una esaltazione della spinta, su base quantitativa. Proprio per questa situazione di equilibrio dinamico tra salute, benessere e produzioni, risulta estremamente critico valutare se l'organismo animale, nel corso della sua vita zootecnica, sia in grado di compensare o meno la generazione di radicali liberi e dei conseguenti prodotti della cascata ossidativa, attraverso i vari sistemi (enzimatici e non) antiossidanti dell'organismo.

Da un punto di vista prognostico, si distinguono situazioni di *eu-stress* e di *di-stress*. Nel primo caso, l'organismo riesce ad elaborare una risposta adattativa al *challenge* ossidante, che si esprime attraverso una tempestiva attivazione dei meccanismi anti-ossidanti in grado di compensare il momentaneo squilibrio. In condizioni di *di-stress*, tale risposta adattativa non risulta adeguata all'insulto ossidante e tale situazione di scompenso può essere considerata prodromica all'insorgenza di patologie che compromettono la salute dell'animale e la qualità delle sue produzioni.

## Stress ossidativo e genetica negli animali da reddito

Gli animali da reddito sono caratterizzati da una aspettativa di vita limitata, in quanto condizionata da logiche economico-produttive. Il fattore di rischio principale per quanto riguarda lo stress ossidativo è costituito quindi dalla selezione genetica, volta alla scelta di linee caratterizzate da un elevato anabolismo proteico, in massima parte determinato da una efficace secrezione endogena di ormone della crescita. Proprio per il forte metabolismo ossidativo promosso dall'ormone della crescita, l'organismo è sottoposto ad un continuo *challenge* ossidante.

Nelle linee di suini a rapido accrescimento, ad alta selezione genetica, esiste una predisposizione a malattie metaboliche su base ossidativa, che nel caso della *Mulberry Heart Disease* (MHD) si estrinseca attraverso una lipoperossidazione delle membrane vasali, accompagnata da essudazione fibrinosa e coagulazione intravasale disseminata (1).

In tale caso, il fattore di rischio è rappresentato dalla sproporzione tra dimensioni del sistema cardio-circolatorio e la massa muscolare che deve essere irrorata dal sangue. Tale squilibrio progressivamente causa una ipossia tissutale, responsabile di una progressiva insufficiente compartimentalizzazione dei radicali liberi all'interno della cellula.

È interessante notare, come in razze di suini meno selezionate, i livelli basali di radicali liberi nel siero, misurati come Metaboliti Reattivi dell'Ossigeno (ROMs), risultino significativamente inferiori rispetto ai livelli riscontrati in razze a rapido accrescimento e geneticamente a rischio di MHD.

A differenza della clinica umana, dove l'analisi biochimico-clinica riguarda ciascun individuo singolarmente, nella clinica veterinaria, in particolar modo in quella riguardante gli animali da reddito, si parla di "diagnosi di popolazione"; infatti il costo sostenuto per analisi individuali non risulterebbe compatibile con i benefici.

Negli animali da reddito vengono notevolmente abbattuti molti dei fattori di confondimento legati alle abitudini di vita del singolo individuo, in quanto si condividono di fatto la genetica, il tipo di alimentazione zootecnica, l'ambiente di vita, la gestione della stalla.

È possibile quindi effettuare di fatto una "fotografia biochimico-clinica" di allevamento, ricorrendo agli strumenti propri dell'interferenza statistica, per selezionare un campione rappresentativo.

Un altro aspetto peculiare riguarda la praticabilità di tali metodi. Proprio perché inseriti in un contesto di valutazione economica, la loro applicabilità deve essere compatibile con i costi contenuti, con la facilità di esecuzione in condizioni di campo, ivi incluse le modalità di prelievo e di conservazione del campione, con tempi di risposta rapidi. Infatti, se valutate per tempo, le situazioni di *di-stress* ossidativo, possono essere in qualche modo recuperate, limitando l'insorgenza di sindromi da minor rendimento o compromissioni del benessere e della salute dell'animale, che sul piano economico sarebbero maggiormente penalizzanti per l'allevatore.

## Applicazioni di interesse veterinario

La valutazione dello stress ossidativo si presta a diverse applicazioni di interesse veterinario in quanto può segnalare determinate situazioni negative a livello di allevamento e quindi suggerire il fronte di intervento più adatto per riportare alle condizioni ottimali.

Gli effetti negativi osservabili in animali in stato di *di-stress*, infatti, sono il risultato nello specifico di una serie di meccanismi di regolazione che si verificano a vari livelli dell'organismo (vedi Tabella 1) (2) e che, se perduranti, possono compromettere lo stato di benessere dell'animale, e risultare prodromici all'insorgenza di malattie, sia infettive che metaboliche.

## Valutazione dello stress da trasporto

Nella valutazione del benessere animale un innalzamento di ROMs non controbilanciato da una adeguata risposta antiossidante può rispecchiare una situazione di stress dovuta, ad esempio, alle cattive condizioni di trasporto (viaggi lunghi, sovraffollamento, alte temperature, sete, operazioni di carico-scarico) (3).

**Tabella 1. Possibili effetti controproducenti sul benessere animale in caso di stati di di-stress ossidativo cronico**

<b>Sistema interessato</b>	<b>Effetti provocati dai radicali liberi</b>	<b>Conseguenze</b>
Sistema immunitario	Inibizione dell'espressione dei geni dell'IL-2 a livello di linfociti T <i>helper</i>  Inibizione dell'espressione dei geni del TNF alfa a livello di linfociti T <i>helper</i>	Minore reattività del sistema immunitario, diminuita efficacia della profilassi vaccinale
Sistemi metabolici	Inibizione dell'espressione dei geni del CD3 e CD16 a livello di linfociti periferici Espressione di citochine Diminuzione dei livelli di RNA a livello mitocondriale Inibizione della sintesi di mRNA per insulina nelle cellule pancreatiche beta Repressione dei geni CYP, responsabili degli enzimi mono-ossigenasi, coinvolti nel metabolismo di numerosi xenobiotici con anelli aromatici (IPA, diossine,...) Inibizione dell'assorbimento di Ferro. Tramite minore espressione del mRNA del recettore della transferrina, suo sequestro in compartimenti cellulari per inibire la reazione di propagazione radicalica Ossidazione dei gruppi tiolici	Sindrome da minore rendimento  Non ottimale conversione dell'energia della razione Ritardata deplezione di farmaci veterinari dall'organismo animale  Aggravamento dei quadri anemici nei vitelli a carne bianca  Minore disponibilità di aminoacidi essenziali, quali la metionina, nella razione degli animali
Sistema ormonale	Repressione della sintesi di eritropoietina a livello renale Alterazione della funzionalità dei recettori per i glucocorticoidi e probabilmente per gli estrogeni, dovuta ad ossidazione dei gruppi sulfidrilici	Aggravamento dei quadri anemici nei vitelli a carne bianca Compromessa reattività di reazione allo stress mediante secrezione di corticosteroidi. Turbe riproduttive, ipofertilità
Sistema muscolare	Repressione dell'espressione del gene della miosina creatinina fosfochinasi a livello di muscolo cardiaco	Disfunzioni cardio-circolatorie

## Valutazione di trattamenti farmacologici in atto

I parametri di stress ossidativo possono fungere, inoltre, da biomarcatori per la rilevazione di trattamenti di massa illeciti ad azione ormonale.

In zootecnia, gli animali allevati per la produzione di carne possono essere sottoposti a trattamenti illeciti con estrogeni; sulla base di studi sperimentali si è potuto constatare come vitelli esposti all'assunzione di 17- $\beta$  estradiolo tramite il colostro o trovati con livelli plasmatici superiori ai limiti di legge, presentassero livelli di ROMs significativamente più elevati, non controbilanciati da un'adeguata risposta antiossidante (4). Tale riscontro trova spiegazione con la formazione di metaboliti radicalici, la cui formazione può essere favorita anche dalla presenza della lattoperossidasi.

## Qualità dell'ambiente in cui vivono gli animali

Condizioni di alimentazione forzata, sovraffollamento, ventilazione inadeguata proprie degli allevamenti intensivi possono determinare situazioni di *di-stress* ossidativo cronico.

Gli animali in allevamento possono venire a contatto con una varietà di contaminanti ambientali attraverso differenti vie, quali l'alimentazione, il particolato presente nell'aria, i sedimenti presenti nell'acqua. I contaminanti maggiormente implicati nella produzione di radicali liberi comprendono: gli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA), i pesticidi organoclorurati (DDT, dieldrin), prodotti industriali quali clorofenoli, policlorobifenili (PCB), esacloro-esani, ed esaclorobenzeni, dibenzo-p-diossine e dibenzofurani, composti nitroaromatici, composti organometallici, fertilizzanti organofosforici, composti estrogenici e molti metalli inclusi cadmio (Cd), cromo (Cr), rame (Cu), ferro (Fe), mercurio (Hg), zinco (Zn), piombo (Pb) (5).

La produzione di ROS stimolata dai contaminanti e risultante nel danno ossidativo, può essere un meccanismo della tossicità negli organismi acquatici esposti a inquinamento (6).

## Alimentazione animale

La valutazione della presenza di lipoperossidi applicata al controllo delle materie prime destinate all'alimentazione animale può indicare la presenza di alcuni fattori di rischio sanitari, quali micotossine o sostanze lipidiche perossidate, e quindi può indirizzare l'allevatore verso scelte volte al raggiungimento di standard di alimentazione adeguati in termini di benessere animale e di prestazioni produttive.

Una cattiva conservazione delle materie prime, nel caso in cui, ad esempio, lo stoccaggio sia avvenuto in condizioni di temperatura elevata e di esposizione alla luce, può portare ad irrancidimento, dovuto alla decomposizione dei costituenti grassi con formazione di perossidi e conseguenti alterazioni organolettiche del prodotto. La somministrazione agli animali di tali alimenti alterati porta a riduzione dell'apporto e dell'efficienza dell'alimento, soprattutto quando il livello di perossidi raggiunge valori molto alti, ad esempio 4-7 mg/Kg nel caso di mangime per polli (7). Inoltre, è stato dimostrato che lo stress ossidativo nella pianta può essere un pre-requisito per la produzione di aflatossina in prodotti di origine vegetale da parte di colonie di *Aspergillus flavus* e *parasiticus*, essendo questa stimolata dalla presenza di lipoperossidi con conseguenze negative sulla salute animale e umana (8, 9).

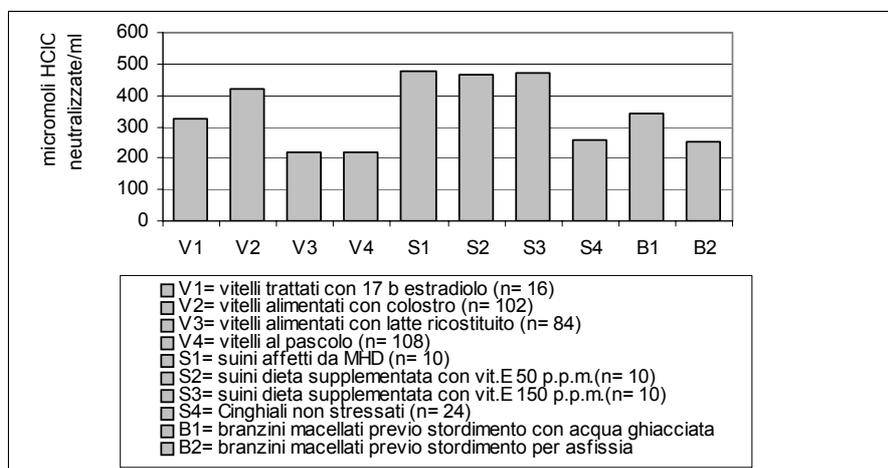
La sicurezza e la qualità dei mangimi, dunque, costituiscono la base per la sicurezza dei prodotti di origine animale destinati al consumo umano; perciò, un mangime che già in partenza contiene alti livelli di perossidi può solo peggiorare la stabilità del grasso corporeo degli animali allevati e quindi portare ad un prodotto finale di qualità inferiore e non salubre.

## Benessere alla macellazione

Le tecniche di macellazione prevedono di solito lo stordimento preventivo dell'animale, seguito immediatamente dalla sua uccisione. Quando lo stordimento non risulta efficace e/o l'intervallo tra perdita di coscienza e uccisione risulta prolungato, il quadro di ipossia che si verifica a livello tissutale genera un aumento dei radicali liberi nel sangue. Questo fenomeno è stato verificato nel pesce di allevamento, stordito prima della macellazione in modo rapido tramite shock termico, oppure, lasciato morire per asfissia. Nel primo caso i livelli di ROMs sono risultati significativamente ridotti rispetto al secondo caso, determinando inoltre le condizioni iniziali per una migliore conservabilità del prodotto ittico.

## Profili di PAO e di ROMs in animali da reddito

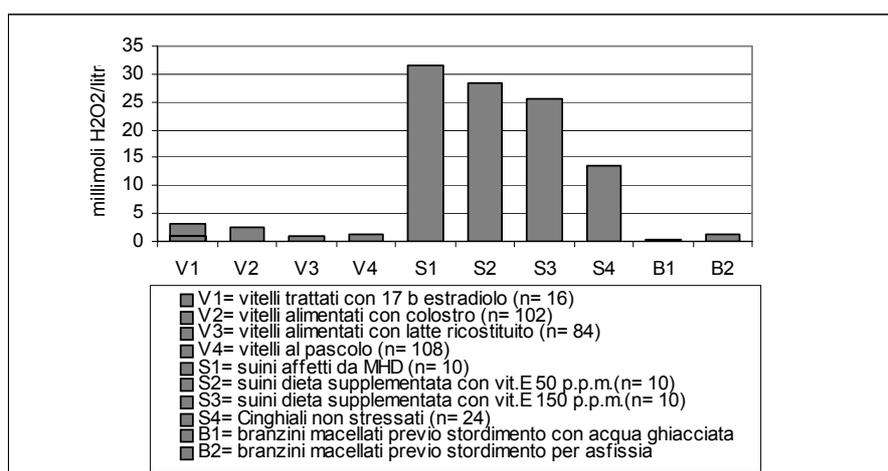
Nelle Figure che seguono (Figura 1 e Figura 2) si riportano i principali profili di potere antiossidante (PAO) e dei metaboliti reattivi dell'ossigeno (ROMs) riscontrati in diverse specie animali, in riferimento alle diverse condizioni di allevamento (4,10-11).



**Figura 1. Profilo di PAO in diverse specie di animali da reddito a differenti livelli di benessere**

Si può notare come, esista una variabilità di specie e come in generale, ad un aumentare dei livelli di ROMs nel siero, corrisponda un analogo innalzamento in valore assoluto del PAO.

In base a studi di correlazione tra valori di ROMs e di PAO in sieri suini (11), si è potuto constatare come, in presenza di valori basali di radicali liberi il coefficiente di correlazione sia vicino allo zero, in quanto mancherebbe lo stimolo adeguato ad attivare una risposta antiossidante.



**Figura 2. Profilo di ROM in diverse specie di animali da reddito a differenti livelli di benessere**

Quando i valori di ROMs superano il livello basale, invece, tale coefficiente di correlazione può essere positivo, qualora la capacità antiossidante dell'organismo sia in grado di compensare (*eu-stress*), o negativo, qualora tale compensazione risultasse insufficiente (*di-stress*).

Oltre alla variabilità di specie del profilo PAO/ROMs, è interessante notare una certa variabilità di razza all'interno della stessa specie suina in base al grado di selezione genetica.

## Conclusioni

La valutazione dello stress/*di-stress* ossidativo negli animali da reddito costituisce un parametro utile per definire lo stato di benessere, unitamente agli altri accertamenti biochimico-clinici. Alla luce delle numerose cause, genetiche, alimentari, ambientali che concorrono a generare e amplificare la catena radicalica, è necessario inserire il quadro laboratoristico all'interno di una valutazione clinica che tenga conto di una accurata anamnesi e diagnosi differenziale di stalla. In tal senso può risultare utile una georeferenziazione dell'attività zootecnica, per valutare l'eventuale esposizione a fonti di inquinamento, come ad esempio l'impatto di emissioni da stabilimenti industriali o la presenza di discariche poste nelle vicinanze dell'allevamento, o l'uso di pesticidi nel corso delle normali pratiche agro-zootecniche.

È di sicuro utile avvalersi dei registri di stalla per recuperare informazioni riguardanti la selezione genetica, gli incrementi ponderali, le rese produttive, ed eventuali episodi di perossidazione lipidica rilevati in sede di macellazione o in fase di stagionatura dei prodotti trasformati.

È opportuno, inoltre, porre molta attenzione agli alimenti somministrati agli animali, in quanto, come già accennato precedentemente, i mangimi in cattive condizioni di conservazione costituiscono un fattore pro-ossidante, sia per l'elevato contenuto in lipoperossidi che per la possibilità maggiore di contenere contaminanti ambientali, quali le micotossine.

È compito dell'allevatore condurre l'attività zootecnica in modo da rispettare le norme fissate dalla legge per il mantenimento delle condizioni di benessere animale e apportare opportuni correttivi in modo tempestivo ad eventuali situazioni di stress cronico che conducono a situazioni sanitarie più difficilmente recuperabili.

Nel settore della ricerca sanitaria, gli animali da reddito, in virtù della selezione genetica operata per selezionare le linee che meglio utilizzano l'energia fornita con l'alimento, possono costituire un modello biologico per lo studio biochimico e genetico comparato dei fattori eziologici alla base degli squilibri ossidativi legati al metabolismo glucidico e lipidico.

## Bibliografia

1. Rice D.A., Kennedy S. Vitamin E, selenium, and polyunsaturated fatty acid concentrations and glutathione peroxidase activity in tissues from pigs with dietetic microangiopathy (mulberry heart disease). *Am J Vet Res* 1989;50:2101-04.
2. Brambilla G. Genetica, selezione e benessere animale. In: 5° Congresso Nazionale Multisala Sivar. Cremona, 30-31 maggio 2003.
3. Chirase NK, Greene LW, Purdy CW, Loan RW, Auvermann BW, Parker DB, Walborg EF Jr, Stevenson DE, Xu Y, Klaunig JE. Effect of transport stress on respiratory disease, serum antioxidant status, and serum concentrations of lipid peroxidation biomarkers in beef cattle. *Am J Vet Res* 2004;65 860-64.

4. Brambilla G, Ballerini A, Civitareale C, Fiori M, Neri B, Cavallina R, Nardoni A, Giannetti L. Oxidative stress as a bio-marker of estrogen exposure in healthy veal calves. *Anal Chim Acta* 2003;483:281-88.
5. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radic Biol Med*. 1999 Oxford University Press, Oxford.
6. Livingstone DR. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organism. *Marine Poll Bull* 2001;42:656-66.
7. Harris LE. Nutrition research techniques for domestic and wild animals. 1970; vol. 1 In: *An International record system and procedures for analyzing samples*. 1408 Highland Drive. Logan. Utah 84321, U.S.A.
8. Fanelli C, Fabbri AA, Finotti E, Passi S. Stimulation of aflatoxin biosynthesis by lipophilic epoxides. *J Gen Microbiol* 1983;129: 1721-23.
9. Fanelli C, Fabbri AA, Finotti E, Fasella P, Passi S. Free Radicals and aflatoxin biosynthesis. *Experientia* 1984;40:191-93.
10. Brambilla G, Fiori M, Archetti LI. Evaluation of the oxidative stress in growing pigs by microplate assays. *J Vet Med A Med A* 2001;48:33-38.
11. Ballerini A, Civitareale C, Fiori M, Regini M, Betti M, Brambilla G. Traceability of inbred and crossbred Cinta Senese pigs by evaluating the oxidative stress. *J Vet Med A* 2003;50:113-16.

# ANTIOSSIDANTI POLIFENOLICI DELLA DIETA NELLA PREVENZIONE DELLE PATOLOGIE DEGENERATIVE

Donatella Pietraforte  
Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze

## Introduzione

Il consumo di cibi e bevande ricchi in antiossidanti è stato spesso associato ad una diminuzione del rischio di insorgenza di malattie degenerative (1-3). Questa capacità di prevenzione dalle malattie degenerative è stata attribuita principalmente ai polifenoli che hanno mostrato attività antiossidante sia *in vitro* che in modelli animali (4-6). Tuttavia, nonostante esistano dati epidemiologici molto forti a supporto dell'effetto di prevenzione, studi biochimici non sono riusciti a stabilire con certezza il reale contributo e l'efficacia del consumo di antiossidanti naturali (7-9) tanto che per alcuni di essi si è addirittura ipotizzata una capacità pro-ossidante alla base degli effetti biologici (10-12). Studi riguardanti il miglioramento delle capacità antiossidanti del plasma non hanno prodotto dati significativi quando si sono confrontati i risultati ottenuti con polifenoli somministrati come integratori alimentari oppure con cibi o bevande ricchi degli stessi antiossidanti, (7, 8, 13).

Se dai dati ottenuti *in vitro* era quindi possibile spiegare la capacità dei polifenoli di ridurre il danno ossidativo indotto sui *targets* biologici in base alla loro capacità antiossidante (ipotesi antiossidante), questa teoria non era sufficiente a rendere conto di altri effetti cellulari osservati sia *in vitro* che *in vivo* in modelli animali, quali ad esempio l'attivazione o inibizione di enzimi, le attività citotossica, antimutagenica e chemopreventiva. Questi effetti attribuivano a questi composti una vera e propria attività di molecole segnale (ipotesi delle molecole segnale) in grado quindi di modulare i *pathways* intracellulari e indirizzare l'attività delle cellule verso destini ben diversi, ovvero sopravvivenza o apoptosi.

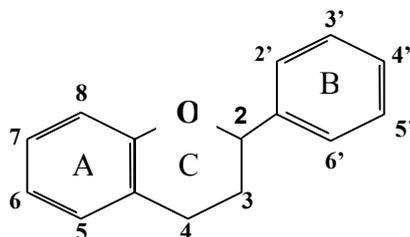
## Ipotesi antiossidante

Negli alimenti di origine vegetale sono presenti più di 5.000 polifenoli la maggior parte dei quali è rappresentata dai flavonoidi che comprendono flavanoli, flavonoli, flavoni, flavanoni, isoflavoni, idrossicinnamati e antocianine. Questi composti sono distribuiti tra piante, frutta e vegetali in quantità variabile e con diversa attività antiossidante e sono i più abbondanti antiossidanti della nostra dieta: una portata tipo di 200 g di frutta contiene circa 500 mg di polifenoli totali.

L'attività antiossidante dei polifenoli è legata alla loro struttura e al potenziale di riduzione. Per quanto riguarda la struttura, la capacità antiossidante dipende dal *pattern* di idrossilazione, ovvero dal numero, dalla specifica posizione e dalla sostituzione di specifici gruppi idrossilici che differenziano i singoli composti (10, 14).

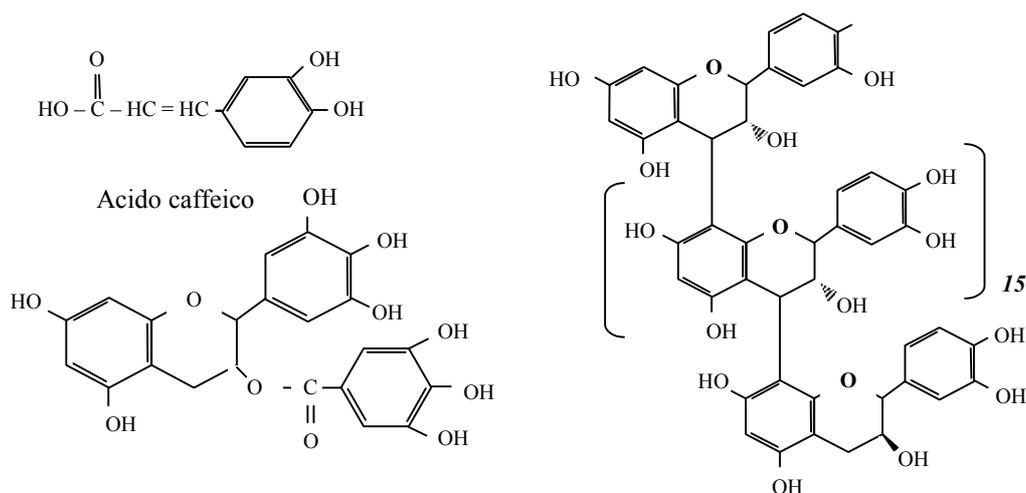
In Figura 1 è mostrata la struttura base dei flavonoidi. Ai fini dell'attività antiossidante e di detossificazione dei radicali sono importanti le seguenti strutture: la presenza di due o tre gruppi idrossilici adiacenti sull'anello B (funzione catecolica, in posizione 3' e 4', e funzione pirogallolo, in posizione 3', 4' e 5', rispettivamente), la presenza di altri gruppi idrossilici negli

altri anelli (posizioni 5 e 7 dell'anello A; posizione 3 dell'anello C), un doppio legame C2-C3 nell'anello C. Altri gruppi idrossilici possono essere presenti ad esempio in posizione 5' dell'anello B, e altri tre nelle posizioni 3', 4' e 5' di un gruppo gallato esterificato in posizione 3 dell'anello C.



**Figura 1. Struttura base dei flavonoidi**

La Figura 2 mostra alcune strutture dei flavonoidi che evidenziano come questi composti possano essere molto semplici, come l'acido caffeico, o complessi, come l'epigallocatechina gallato. I flavonoidi possono essere inoltre presenti in strutture polimeriche come i tannini, rappresentati negli alimenti dalle proantocianidine (nell'esempio di Figura 2, unità ripetute di catechina ed epicatechina) e tannini idrolizzabili, come il glucosio esterificato con residui di acido gallico).



**Figura 2. Strutture di alcuni flavonoidi**

Il potenziale di riduzione è una misura della reattività di un antiossidante come donatore di idrogeno o di elettroni in condizioni standards (Tabella 1): un basso potenziale di riduzione indica una maggiore capacità nel donare idrogeno o elettroni e quindi di ridurre specie reattive con elettroni spaiati. I polifenoli hanno in genere un potenziale di riduzione medio nella scala degli antiossidanti naturali, paragonabile a quello della vitamina E (15, 16), ma più elevato di quello dell'acido ascorbico (Tabella I), considerato il migliore antiossidante naturale (17).

**Tabella 1. Potenziali di riduzione di alcuni polifenoli e antiossidanti naturali della dieta**

Antiossidante	Potenziale di riduzione <sup>a</sup> (mV)
Ascorbato (vitamina C)	282
Epigallocatechina gallato	430
$\alpha$ - tocoferolo (vitamina E)	500
Teaflavina	510
Acido caffeico	540
Epicatechina	570
Acido urico	590
Glutazione (cisteina)	920

<sup>a</sup> Potenziali di riduzione standard a pH 7.0, 20 °C (17, 18)

I polifenoli sono in grado di detossificare *in vitro* le specie reattive dell'ossigeno, dell'azoto e del cloro, quali i radicali superossido e idrossile, (19), ossigeno singoletto (20), radicali perossilici (21), il perossinitrito (22) e l'acido ipocloroso (19). Una proprietà importante legata principalmente alla struttura catechinica è la capacità di complessare i metalli di transizione (rame e ferro, principalmente) prevenendone l'attività catalitica nelle reazioni redox (23, 24). Tuttavia in alcuni studi, i polifenoli soprattutto ad alta concentrazione hanno indotto un aumento del danno mediato da metalli principalmente per le loro capacità di riducenti (10-12, 25, 26). Inoltre, i polifenoli mostrano anche attività propriamente anti-infiammatoria attribuita alla inibizione di ciclossigenasi (27, 28), lipossigenasi (27, 29), mieloperossidasi (30), ossido nitrico sintetasi (31) e xantina ossidasi (32).

## Fattori che contribuiscono alla differente attività biologica dei polifenoli *in vitro* e *in vivo*

Se nella letteratura scientifica è presente una enorme quantità di dati riguardanti la capacità antiossidante *in vitro* dei singoli composti polifenolici, l'efficacia del consumo degli stessi composti o con diete ricche di questi composti non è stata sempre confermata in *trials* clinici condotti nell'uomo (8, 33, 34) (3, 34-47). Mentre in alcuni casi sono state ottenute evidenze di un effetto protettivo (37-39, 43-45) in altri non è stato possibile correlare positivamente l'efficacia del consumo di polifenoli con marcatori di stress ossidativo (i marcatori della perossidazione lipidica come gli F2-isoprostani, le concentrazioni plasmatiche di LDL ossidate, i prodotti di ossidazione della proteine plasmatiche, e il danno al DNA (34-36, 40-42, 46, 48). In uno studio sono stati riportati aumenti di prodotti di ossidazione delle proteine plasmatiche dopo il consumo di succo di frutta (47). Recentemente è stato osservato *in vivo* che il consumo frequente di bevande (tè) e cibi (mele) ricchi di polifenoli risulta in un aumento modesto e transiente nella capacità antiossidante totale del plasma ascrivibile però ad un aumento dei livelli di urato (49). Questo effetto, almeno nel caso delle mele, è dovuto al fruttosio e non ai polifenoli (50). In generale, assumere un antiossidante attraverso cibi e bevande ha un effetto diverso rispetto all'assunzione della stessa molecola come integratore alimentare (51, 52). Questa differenza è stata riportata, ad esempio, per i polifenoli del tè (52) e per l'acido ascorbico vitamina C (53), ma le cause di questo fenomeno sono ancora poco chiare.

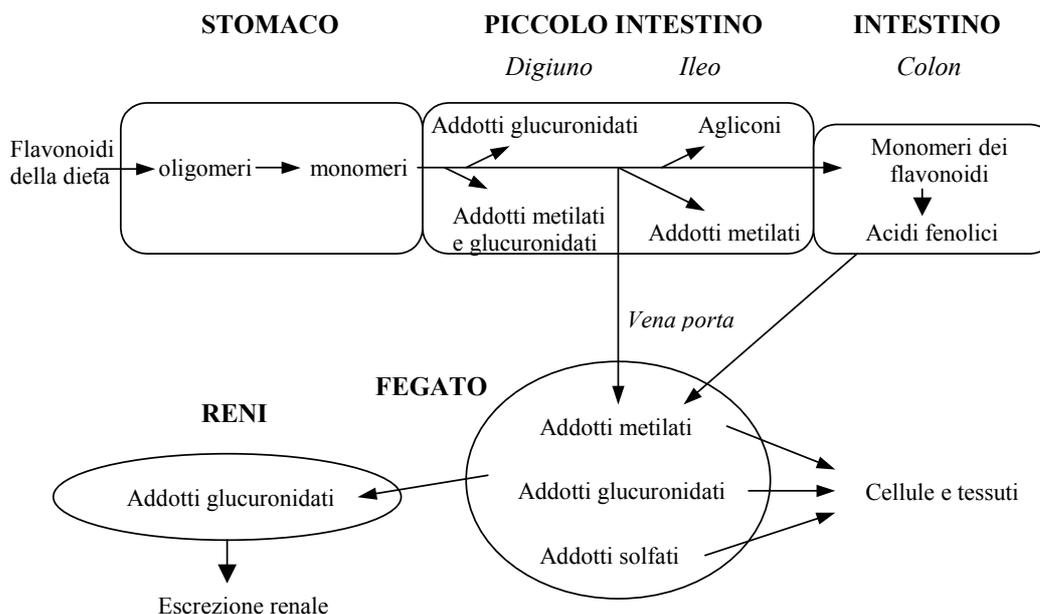
I motivi delle differenti attività biologiche mostrate dai polifenoli *in vitro* e *in vivo* sono correlabili non solo alla eterogeneità di queste molecole e alle caratteristiche strutturali e funzionali, ma da come questi composti sono assorbiti, e metabolizzati nel distretto gastroenterico.



Questo *pathway* è tuttavia poco importante data la presenza di un efficiente sistema di efflusso dei glucosidi intracellulari verso il lumen del tratto digestivo sostenuto dal trasportatore Multidrug Resistance Associated Protein 2 (MRP2; UDP-GTRF, UDP-glucuronosil transferase;). Nel lumen del tratto digestivo, grazie alla presenza della flora batterica intestinale, i glucosidi dei flavonoidi sono definitivamente trasformati ad agliconi e assorbiti come tali dalle cellule intestinali e nel sangue tramite il Multidrug Resistance Associated Protein 3 (MRP3; STRF, sulfotransferase) (63).

## Biotrasformazione a livello gastrico

La cavità orale e il tratto gastro-intestinale giocano un ruolo significativo nel metabolismo/coniugazione dei polifenoli prima che questi entrino nel sistema circolatorio e nel fegato, e in questa sede i polifenoli subiscono differenti trasformazioni chimiche che portano alla formazione di metaboliti con attività biologica propria. Nella saliva, i glucosidi dei flavonoidi sono idrolizzati ad agliconi e quindi trasformati in composti che possono essere assorbiti dall'epitelio del cavo orale (57). Nello stomaco avviene principalmente la riduzione dei polifenoli ad unità monomeriche (Figura 4) mentre nel piccolo intestino, e successivamente nel fegato, avviene la vera e propria trasformazione secondo due fasi: Fase I, deglicosilazione e formazione degli agliconi, e Fase II, trasformazione attraverso il metabolismo ossidativo ad opera degli enzimi appartenenti alla famiglia dei citocromi P450 (64), oppure trasformazioni metaboliche che portano alla formazione di (a) prodotti metilati, solfati e glucuronidati (8, 56, 58, 59, 64, 65), (b) ad addotti con proteine o con tioli (ad esempio, con il glutatione) (66), (c) addotti con RNA o DNA (67), ma anche (d) all'apertura dell'anello aromatico.



**Figura 4. Principali vie di biotrasformazione dei flavonoidi a livello gastrico**

Una ulteriore trasformazione avviene a livello del colon dove la microflora dell'intestino degrada i flavonoidi a semplici acidi fenolici, successivamente assorbiti e metabolizzati nel

fegato. Va sottolineato, tuttavia, che i coniugati glucuronidati e solfati, le forme metilate e gli addotti possono essere dotati a loro volta di attività biologica (68). La capacità antiossidante di questi composti trasformati è in genere minore rispetto alla molecola di origine perché tali modifiche avvengono a carico degli stessi gruppi (idrossilici) responsabili dell'attività antiossidante (65). Inoltre i metaboliti hanno una diversa capacità di accesso e compartimentalizzazione all'interno dei tessuti (es. diversa lipoficità).

### **Attività tipo xenobiotici**

I polifenoli e i prodotti del loro metabolismo possono indurre effetti citotossici tipici degli xenobiotici sia *in vitro* che *in vivo* (33, 69, 70). Questi effetti sono presentati nel capitolo seguente.

### **Coopertività e sinergismo tra antiossidanti assunti con la dieta e antiossidanti endogeni**

Questa capacità è dovuta al potenziale redox degli antiossidanti (Tabella I). Antiossidanti con potenziale redox più basso (più riducenti) sono in grado di rigenerare (ridurre) altri antiossidanti a loro volta ossidati nelle reazioni radicaliche. Ad esempio, reazioni di rigenerazione avvengono tra i polifenoli l'acido ascorbico e la vitamina E (71).

### **Ipotesi dei polifenoli come molecole segnale**

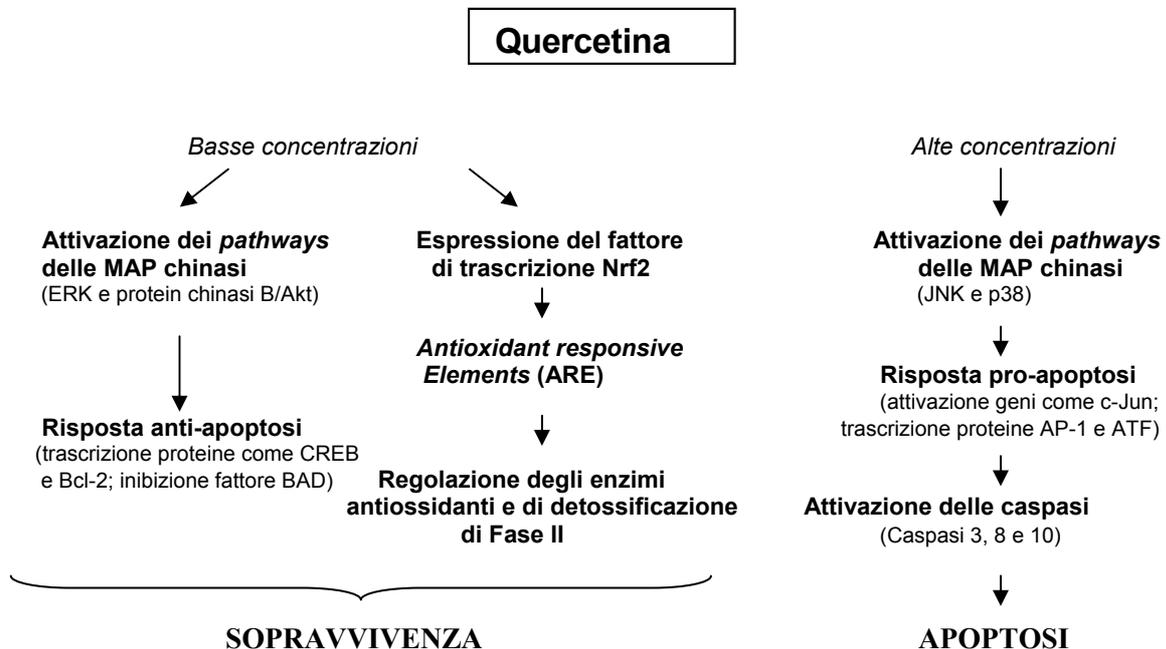
I polifenoli sono in grado, di modificare lo stato di fosforilazione cellulare e/o l'espressione genica attraverso l'attivazione o inibizione di specifiche chinasi (72), quali ad esempio le tirosin chinasi, le MAP chinasi, le fosfoinositide-3 chinasi, la protein chinasi B/Akt e le protein chinasi C (68, 72-74). La modulazione dell'attività di queste chinasi regola il destino cellulare verso la sopravvivenza o l'apoptosi in funzione del tipo di *pathway* coinvolto. Nel sistema nervoso centrale, ad esempio, l'attivazione delle MAP chinasi ERK1/2 o JNK si traduce in effetti opposti, essendo la prima un segnale di sopravvivenza e la seconda di apoptosi, mentre l'effetto dell'attivazione della protein chinasi B/Akt è legato con l'inibizione di proteine chiave dell'apoptosi (come la proteina pro-apoptotica BAD) e i componenti della famiglia delle caspasi (come le caspasi 3, 8, 10) (72).

Sebbene la modulazione di queste vie metaboliche possa risultare protettiva nella regolazione di segnali coinvolti nell'insorgenza e sviluppo di alcune patologie (tumori, patologie cardiovascolari e neurodegenerative), in altri tessuti tale modulazione può essere sfavorevole in sistemi ove le chinasi sono utilizzate nella regolazione di funzioni chiave per la sopravvivenza e funzionalità cellulare. Questo è importante in particolare nel sistema nervoso centrale immaturo in cui l'attività delle chinasi è correlata con la regolazione della sopravvivenza (sinaptogenesi e crescita dei neuriti). I neuroni maturi al contrario utilizzano la cascata delle MAP chinasi e delle fosfoinositide-3 chinasi per la plasticità sinaptica e la formazione della memoria (72). L'interazione dei polifenoli con queste vie metaboliche potrebbe avere quindi effetti imprevedibili a seconda del tipo di composto utilizzato e del tipo di cellula bersaglio.

Gli effetti dei polifenoli sui segnali cellulari è legato alla loro struttura chimica e alla concentrazione alla quale vengono utilizzati. Il numero e la specifica posizione dei gruppi idrossilici (Figura 1), e la natura delle sostituzioni oltre a determinare la lipoficità del

composto e quindi l'accesso al milieu intracellulare, determinano l'attivazione o inibizione di enzimi e/o l'inibizione della crescita e proliferazione cellulare. Ad esempio, nel caso specifico delle chinasi, resveratrolo e naringenina si legano grazie alla loro struttura ai siti di legame per l'ATP delle chinasi inducendo un cambio conformazionale di queste ultime e quindi l'inibizione della loro attività (72). Inoltre, le modifiche metaboliche dei polifenoli cambiano i segnali intracellulari (72), come mostrato per gli antociani il cui pattern di sostituzione dei gruppi idrossilici ne influenza la capacità di regolazione della crescita cellulare (75).

Per quanto riguarda gli effetti della concentrazione, i polifenoli attivano in modo dose-dipendente vie metaboliche correlate sia con meccanismi di protezione e sopravvivenza sia con l'apoptosi (72), per cui possono agire come agenti chemopreventivi o, paradossalmente, come *chemical stressors*. Ad esempio, la quercetina (Figura 5) a basse concentrazioni attiva la via delle MAP chinasi (ERK1/2 e protein chinasi B/Akt) portando all'espressione di geni della sopravvivenza e dei geni di difesa correlati con gli enzimi antiossidanti e di detossificazione di Fase II (la glutatione S-trasferasi, NAD(P)H:quinone ossidoreduttasi, UDP-glucuronosil transferasi e la superossido dismutasi).



**Figura 5. Esempio di potenziale regolazione da parte dei flavonoidi dei pathways intracellulari correlati con la sopravvivenza o l'apoptosi: la quercetina**

L'induzione degli enzimi antiossidanti e di Fase II da parte dei polifenoli avviene per mezzo di un fattore di trascrizione chiamato *NF-E2-related factor 2* o Nrf2 (Figura 5), la cui attivazione tramite reazioni redox o fosforilazione, porta al legame con specifici *Antioxidant Responsive Elements* (ARE) (76). L'effetto finale è la modifica di composti potenzialmente tossici o cancerogenici attraverso reazioni di acetilazione, metilazione o coniugazione con altri composti, riducendo la loro capacità di reagire e danneggiare acidi nucleici e proteine (77, 78).

Ad alte concentrazioni, la quercetina attiva principalmente le MAP chinasi JNK1 e p38, favorendo l'apoptosi attraverso l'attivazione della cascata delle caspasi (Figura 5) (79).

Infine i polifenoli possono attivare specifici enzimi coinvolti con il mantenimento dell'equilibrio sopravvivenza/apoptosi, quali le deacetilasi. È il caso del resveratrolo (Figura 6) che attraverso l'attivazione della sirtuina (NAD<sup>+</sup>-deacetilasi) promuove la sopravvivenza cellulare favorendo l'attività deacetilasica. La deacilazione della proteina Ku70, ne induce il legame con la proteina Bax promuovendo la sopravvivenza. Analogamente la deacilazione di p53 inibirebbe l'apoptosi favorendo la sopravvivenza cellulare (80).

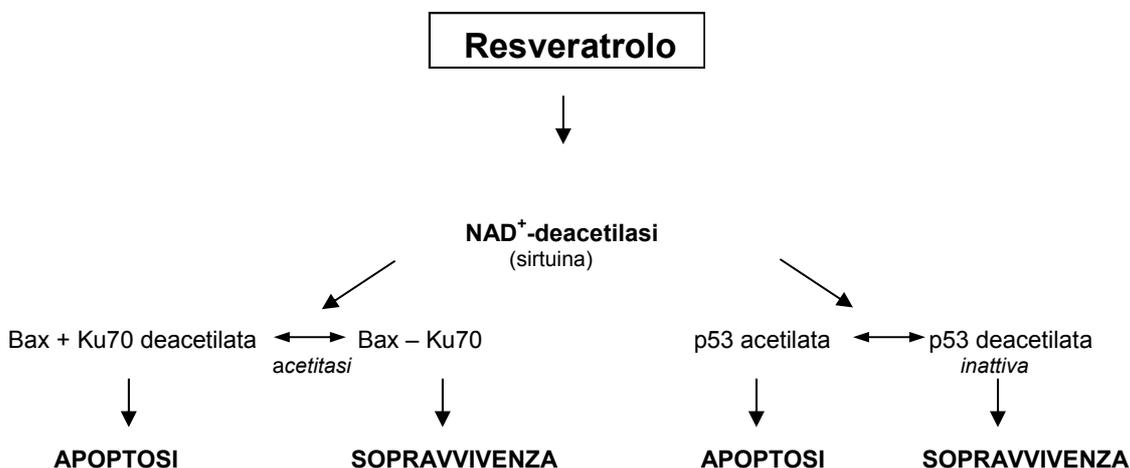


Figura 6. Un altro esempio di potenziale regolazione da parte dei flavonoidi dei pathways intracellulari correlati con la sopravvivenza o l'apoptosi: il resveratrolo

## Attività antiossidante dei polifenoli nel tratto gastrointestinale

Nel tratto oro-faringeo, nello stomaco, e in parte nell'intestino, si può trovare la più alta concentrazione di polifenoli assunti con la dieta prima che inizi il processo di assorbimento e metabolismo. Nel distretto gastrico e dopo una dieta ricca di questi composti, infatti, sono state misurate concentrazioni mM di polifenoli che potrebbero tenere conto del loro effetto protettivo dal cancro a livello gastrico ed enterico. Il tratto gastrointestinale, d'altro canto, è particolarmente esposto alle specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto che possono derivare dalla dieta (60, 81-85) e e/o dall'attivazione dei fagociti nell'intestino (86). In particolare, alle specie reattive dell'azoto è stata riconosciuto un ruolo nella possibilità di insorgenza del cancro allo stomaco poiché sono in grado a pH acido di formare agenti nitranti/nitrosanti e di indurre quindi la formazione di nitrosammine cancerogene. I polifenoli possono avere un effetto protettivo diretto sul tratto gastrointestinale detossificando le specie reattive di ossigeno, azoto e cloro (18), preservando le difese antiossidanti (87) e complessando i metalli in transizione (23, 24). Alcuni recenti lavori hanno approfondito lo studio degli effetti protettivi di una dieta ricca di polifenoli in modelli gastrici (84, 88-90), nella saliva acidificata (91) o *in vivo* (88, 89).

Va inoltre considerato nello stomaco il pH acido amplifica le reazioni di perossidazione catalizzate da composti pro-ossidanti assunti con la dieta, ad esempio con la carne (es. Fe<sup>3+</sup>-mioglobina, ferro non coniugato, acidi grassi e idroperossidi) (84). Queste reazioni sono state inibite dalla catechina e dai polifenoli del vino rosso che si sono dimostrati capaci nel modello

gastrico di spostare gli equilibri delle reazioni da pro-ossidanti ad antiossidanti. Analoghi risultati sono stati osservati in altri studi (88-91) ottenuti in condizioni più vicine alle fisiologiche e a concentrazioni di polifenoli riscontrabili nello stomaco dopo un pasto. Sia in questi modelli che in piccoli animali, i polifenoli prevengono la formazione di nitrosammine ritenute coinvolte nello patogenesi del cancro (88-92).

## Conclusioni

Nonostante l'enorme interesse verso i polifenoli come potenziali agenti protettivi contro lo sviluppo di patologie cardiovascolari e degenerative, non sono a tutt'oggi noti il reale contributo di questi composti al mantenimento della salute e il loro meccanismo di azione *in vivo*. Infatti, non ci sono evidenze consistenti che l'effetto antiossidante osservato *in vitro* sia il meccanismo che avviene effettivamente *in vivo*. I flavonoidi sono scarsamente assorbiti nel tratto gastrointestinale ma vengono estesamente metabolizzati in questo distretto formando principalmente coniugati glucuronidati, solfati, e metilati. In queste forme, gli addotti sono successivamente assorbiti. Considerando che i flavonoidi e alcuni loro metaboliti sono potenti molecole bioattive e interagiscono con i *pathways* dei segnali intracellulari, un chiarimento sui loro meccanismi di azione come antiossidanti o come molecole segnale è cruciale per la valutazione del loro potenziale antitumorale o di inibitori delle patologie degenerative. Maggior attenzione, infine, dovrebbe essere data allo studio degli effetti dei polifenoli nel tratto gastrointestinale dove probabilmente questi composti mostrano la maggiore capacità antiossidante prima del loro metabolismo e assorbimento nel torrente circolatorio.

## Ringraziamenti

Questo lavoro è stato supportato parzialmente dal finanziamento "Ricerca Finalizzata Ministero della Salute 2002, Italia", Progetto di Ricerca "Benefici e Rischi degli Antiossidanti di Origine Alimentare nella Prevenzione di Patologie Cronoiche e Degenerative".

## Bibliografia

1. Geleijnse JM, Launer LJ, van der Kuip DA, Hofman A, Witteman JC. Inverse association of tea and flavonoid intakes with incident myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Am J Clin Nutr* 2002;75:880-86.
2. Huxley RR, Neil HA. The relation between dietary flavonol intake and coronary heart disease mortality: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur J Clin Nutr* 2003;57:904-08.
3. van't Veer P, Jansen MC, Klerk M, Kok FJ. Fruits and vegetables in the prevention of cancer and cardiovascular diseases. *Public Healt Nutr* 2000;3:103-07.
4. Youdim KA, Dobbie MS, Kuhnle G, Proteggente AR, Abbott NJ, Rice-Evans C. Interaction between flavonoids and the blood-brain barrier: in vitro studies. *J Neurochem* 2003;85:180-92.
5. Youdim KA, Spencer JP, Schroeter H, Rice-Evans C. Dietary flavonoids as potential neuroprotectants. *Biol Chem* 2002;383:503-19.
6. Bickford PC, Gould T, Briederick L, Chadman K, Pollock A, Young D, Shukitt-Hale B, Joseph J. Antioxidant-rich diets improve cerebellar physiology and motor learning in aged rats. *Brain Res* 2000;866:211-17.

7. Lotito SB, Frei B. Relevance of apple polyphenols as antioxidants in human plasma: contrasting *in vitro* and *in vivo* effects. *Free Radic Biol Med* 2004;36:201-11.
8. Rice-Evans C. Flavonoid antioxidants. *Curr Med Chem* 2001;8:797-807.
9. Higdon JV, Frei B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2003;43:89-43.
10. Sadeghipour M, Terreux R, Phipps J. Flavonoids and tyrosine nitration: structure-activity relationship correlation with enthalpy of formation. *Toxicol in Vitro* 2005;19:155-65.
11. Filipe P, Haigle J, Silva JN, Freitas J, Fernandes A, Maziere J-C, Maziere C, Santus R, Morliere P. Anti- and pro-oxidant effects of quercetin in copper-induced low density lipoprotein oxidation: Quercetin as an effective antioxidant against pro-oxidant effects of urate. *Eur J Biochem* 2004;271:1991-99.
12. Laughton MJ, Halliwell B, Evans PJ, Hoult JR. Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. Effects on lipid peroxidation, hydroxyl radical generation and bleomycin-dependent damage to DNA. *Biochem Pharmacol* 1989;38:2859-65.
13. Halliwell B, Rafter J, Jenner A. Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not?. *Am J Clin Nutr* 2005;81:268S-76.
14. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 1996;20:933-56.
15. Jovanovic SV, Steenken S, Simic MG. Reduction potential of flavonoid and model phenoxyl radicals. *J Chem Soc Perkins Tran 2* 1996:2497-503.
16. Jovanovic SV, Hara Y, Steenken S, Simic MG. Antioxidant potential of theaflavins. A pulse radiolysis. *J Am Chem Soc* 1997;119:5337-43.
17. Buettner GR. The Pecking Order of Free Radicals and Antioxidants: Lipid Peroxidation, [alpha]-Tocopherol, and Ascorbate. *Arch Biochem Biophys* 1993;300(2):535-43.
18. Frei B, Higdon JV. Antioxidant Activity of Tea Polyphenols In Vivo: Evidence from Animal Studies. *J Nutr* 2003;133:3275S-8.
19. Paya M, Halliwell B, Hoult JR. Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species. Scavenging of superoxide, hypochlorous acid and hydroxyl radicals. *Biochem Pharmacol* 1992;44:205-14.
20. Guo Q, Zhao B, Shen S, Hou J, Hu J, Xin W. ESR study on the structure-antioxidant activity relationship of tea catechins and their epimers. *Biochim Biophys Acta* 1999;1427:13-23.
21. Paya M, Halliwell B, Hoult JR. Peroxyl radical scavenging by a series of coumarins. *Free Radic Res Commun* 1992;17:293-8.
22. Pannala A, Rice-Evans CA, Halliwell B, Singh S. Inhibition of Peroxynitrite-Mediated Tyrosine Nitration by Catechin Polyphenols. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;232:164-8.
23. Fernandez MT, Mira ML, Florencio MH, Jennings KR. Iron and copper chelation by flavonoids: an electrospray mass spectrometry study. *J Inorg Biochem* 2002;92:105-11.
24. Mira L, Fernandez MT, Santos M, Rocha R, Florencio MH, Jennings KR. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radic Res* 2002;36:1199-208.
25. Labieniec M, Gabryelak T, Falcioni G. Antioxidant and pro-oxidant effects of tannins in digestive cells of the freshwater mussel *Unio tumidus*. *Mutat Res* 2003;539:19-28.
26. Strick R, Strissel P, Borgers S, Smith SL, Rowley JD. Dietary bioflavonoids induce cleavage in the MLL gene and may contribute to infant leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:4790-95.

27. Laughton MJ, Evans PJ, Moroney MA, Hoult JR, Halliwell B. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability. *Biochem Pharmacol* 1991;42:1673-81.
28. Luceri C, Caderni G, Sanna A, P. D. Red wine and black tea polyphenols modulate the expression of cyclooxygenase-2, inducible nitric oxide synthase and glutathione-related enzymes in azoxymethane-induced f344 rat colon tumors. *J Nutr* 2002;132:1376-79.
29. Schewe T, Sadik C, Klotz LO, Yoshimoto T, Kuhn H, Sies H. Polyphenols of cocoa: inhibition of mammalian 15-lipoxygenase. *Biol Chem* 2001;382:1687-96.
30. Wippel R, Rehn M, Gorren ACF, Schmidt K, Mayer B. Interference of the polyphenol epicatechin with the biological chemistry of nitric oxide- and peroxynitrite-mediated reactions. *Biochem Pharmacol* 2004;67:1285-95.
31. Lin Y-L, Lin J-K. Epigallocatechin-3-gallate Blocks the Induction of Nitric Oxide Synthase by Down-Regulating Lipopolysaccharide-Induced Activity of Transcription Factor Nuclear Factor-kappa B. *Mol Pharmacol* 1997;52:465-72.
32. Aucamp J, Gaspar A, Hara Y, Apostolides Z. Inhibition of xanthine oxidase by catechins from tea (*Camellia sinensis*). *Anticancer Res* 1997;17:43818-5.
33. Skibola CF, Smith MT. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radic Biol Med* 2000;29:375-83.
34. Boyle SP, Dobson VL, Duthie SJ, Hinselwood DC, Kyle JA, Collins AR. Bioavailability and efficiency of rutin as an antioxidant: a human supplementation study. *Eur J Clin Nutr* 2000;54:774-82.
35. Freese R, Basu S, Hietanen E, Nair J, Nakachi K, Bartsch H, Mutanen M. Green tea extract decreases plasma malondialdehyde concentration but does not affect other indicators of oxidative stress, nitric oxide production, or hemostatic factors during a high-linoleic acid diet in healthy females. *Eur J Nutr* 1999;38:149-57.
36. O'Reilly JD, Mallet AI, McAnlis GT, Young IS, Halliwell B, Sanders TA, Wiseman H. Consumption of flavonoids in onions and black tea: lack of effect on F2-isoprostanes and autoantibodies to oxidized LDL in healthy humans. *Am J Clin Nutr* 2001;73:1040-44.
37. Bub A, Watzl B, Blockhaus M, Briviba K, Liegibel U, Muller H, Pool-Zobel BL, Rechkemmer G. Fruit juice consumption modulates antioxidative status, immune status and DNA damage. *J Nutr Biochem* 2003;14:90-98.
38. Sanchez-Moreno C, Cano MP, de Ancos B, Plaza L, Olmedilla B, Granada F, Martin A. Effect of orange juice intake on vitamin C concentrations and biomarkers of antioxidant status in humans. *Am J Clin Nutr* 2003;78:454-60.
39. Sanchez-Moreno C, Cano MP, de Ancos B, Plaza L, Olmedilla B, Granada F, Martin A. High-Pressurized Orange Juice Consumption Affects Plasma Vitamin C, Antioxidative Status and Inflammatory Markers in Healthy Humans. *J Nutr* 2003;133:2204-09.
40. Moller P, Vogel U, Pedersen A, Dragsted LO, Sandstrom B, Loft S. No Effect of 600 Grams Fruit and Vegetables Per Day on Oxidative DNA Damage and Repair in Healthy Nonsmokers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* 2003;12:1016-22.
41. Nielsen SE, Young JF, Daneshvar B, Lauridsen ST, Knuthsen P, Sandstrom B, Dragsted LO. Effect of parsley (*Petroselinum crispum*) intake on urinary apigenin excretion, blood antioxidant enzymes and biomarkers for oxidative stress in human subjects. *Br J Nutr* 1999;81:447-55.
42. Young JF, Dragsted LO, Daneshvar B, Lauridsen ST, Hansen M, Sandstrom B. The effect of grape-skin extract on oxidative status. *Br J Nutr* 2000;84:505-13.
43. Collins AR, Harrington V, Drew J, Melvin R. Nutritional modulation of DNA repair in a human intervention study. *Carcinogenesis* 2003;24:511-15.

44. Nakagawa K, Ninomiya M, Okubo T, Aoi N, Juneja LR, Kim M, Yamanaka K, Miyazawa T. Tea catechin supplementation increases antioxidant capacity and prevents phospholipid hydroperoxidation in plasma of humans. *J Agric Food Chem* 1999;47:3967-73.
45. Hakim IA, Harris RB, Brown S, Chow H-HS, Wiseman S, Agarwal S, Talbot W. Effect of Increased Tea Consumption on Oxidative DNA Damage among Smokers: A Randomized Controlled Study. *J Nutr* 2003;133:3303S-9S.
46. Gopaul NK, Halliwell B, Anggard EE. Measurement of plasma F2-isoprostanes as an index of lipid peroxidation does not appear to be confounded by diet. *Free Radic Res* 2000;33:115-27.
47. Young JF, Nielsen SE, Haraldsdottir J, Daneshvar B, Lauridsen ST, Knuthsen P, Crozier A, Sandstrom B, Dragsted LO. Effect of fruit juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidative status. *Am J Clin Nutr* 1999;69:87-94.
48. van den Berg R, van Vliet T, Broekmans WMR, Cnubben NHP, Vaes WHJ, Roza L, Haenen GRMM, Bast A, van den Berg H. A Vegetable/Fruit Concentrate with High Antioxidant Capacity Has No Effect on Biomarkers of Antioxidant Status in Male Smokers. *J Nutr* 2001;131:1714-22.
49. Van Amelsvoort JM, Van Hof KH, Mathot JN, Mulder TP, Wiersma A, Tijburg LB. Plasma concentrations of individual tea catechins after a single oral dose in humans. *Xenobiotica* 2001;31:891-901.
50. Lotito SB, Frei B. The increase in human plasma antioxidant capacity after apple consumption is due to the metabolic effect of fructose on urate, not apple-derived antioxidant flavonoids. *Free Radic Biol Med* 2004;37:251-58.
51. Halliwell B. Establishing the significance and optimal intake of dietary antioxidants: the biomarker concept. *Nutr Rev* 1999;57:104-13.
52. Sesso HD, Gaziano JM, Liu S, Buring JE. Flavonoid intake and the risk of cardiovascular disease in women. *Am J Clin Nutr* 2003;77:1400-8.
53. Moller P, Loft S. Oxidative DNA damage in human white blood cells in dietary antioxidant intervention studies. *Am J Clin Nutr* 2002;76:303-10.
54. Spencer JP, Schroeter H, Rechner AR, Rice-Evans C. Bioavailability of flavan-3-ols and procyanidins: gastrointestinal tract influences and their relevance to bioactive forms in vivo. *Antioxid Redox Signal* 2001;3:1023-39.
55. Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 2000;130:2073S-85S.
56. Rice-Evans C. Flavonoids and isoflavones: absorption, metabolism, and bioactivity. *Free Radic Biol Med* 2004;36:827-28.
57. Walle T, Browning AM, Steed LL, Reed SG, Walle UK. Flavonoid glucosides are hydrolyzed and thus activated in the oral cavity in humans. *J Nutr* 2005;135:48-52.
58. Blaut M, Schoefer L, Braune A. Transformation of flavonoids by intestinal microorganisms. *Int J Vitam Nutr Res* 2003;73:79-87.
59. Olthof MR, Hollman PC, Buijsman MN, van Amelsvoort JM, Katan MB. Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. *J Nutr* 2003;133:1806-14.
60. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 3rd ed. Oxford United Kingdom: Clarendon Press; 1999.
61. Song J, Kwon O, Chen S, Daruwala R, Eck P, Park JB, Levine M. Flavonoid Inhibition of Sodium-dependent Vitamin C Transporter 1 (SVCT1) and Glucose Transporter Isoform 2 (GLUT2), Intestinal Transporters for Vitamin C and Glucose. *J Biol Chem* 2002;277:15252-60.

62. Strobel P, Allard C, Perez-Acle T, Calderon R, Aldunate R, Leighton F. Myricetin, quercetin and catechin-gallate inhibit glucose uptake in isolated rat adipocytes. *Biochem J* 2005;386:471-78.
63. Walle T. Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radic Biol Med* 2004;36(7):829-37.
64. Rechner AR, Kuhnle G, Bremner P, Hubbard GP, Moore KP, Rice-Evans CA. The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radic Biol Med* 2002;33:220-35.
65. Rechner AR, Kuhnle G, Hu H, Roedig-Penman A, van den Braak MH, Moore KP, Rice-Evans CA. The metabolism of dietary polyphenols and the relevance to circulating levels of conjugated metabolites. *Free Radic Res* 2002;36:1229-41.
66. Boersma MG, Vervoort J, Szymusiak H, Lemanska K, Tyrakowska B, Cenas N, Segura-Aguilar J, Rietjens IM. Regioselectivity and reversibility of the glutathione conjugation of quercetin quinone methide. *Chem Res Toxicol* 2000;13:185-91.
67. Awad HM, Boersma MG, Boeren S, van Bladeren PJ, Vervoort J, Rietjens IM. Structure-activity study on the quinone/quinone methide chemistry of flavonoids. *Chem Res Toxicol* 2001;14:398-408.
68. Wiseman S, Mulder T, Rietveld A. Tea flavonoids: bioavailability in vivo and effects on cell signaling *pathways in vitro*. *Antioxid Redox Signal* 2001;3:1009-21.
69. Long LH, Clement MV, Halliwell B. Artifacts in cell culture: rapid generation of hydrogen peroxide on addition of epigallocatechingallate, (+)-catechin, and quercetin to commonly used cell culture media. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;273:50-53.
70. Chai PC, Long LH, Halliwell B. Contribution of hydrogen peroxide to the cytotoxicity of green tea and red wines. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;304:650-4.
71. Bors W, Michel C, Schikora S. Interaction of flavonoids with ascorbate and determination of their univalent redox potentials: a pulse radiolysis study. *Free Radic Biol Med* 1995;19:45-52.
72. Williams RJ, Spencer JPE, Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic Biol Med* 2004;36:838-49.
73. Rosenkranz S, Knirel D, Dietrich H, Flesch M, Erdmann E, Bohm M. Inhibition of the PDGF receptor by red wine flavonoids provides a molecular explanation for the "French paradox". *FASEB J* 2002;16:1958-60.
74. Levites Y, Amit T, Youdim MBH, Mandel S. Involvement of protein kinase C activation and cell survival/ cell cycle genes in green tea polyphenol epigallocatechin 3-gallate neuroprotective action. *J Biol Chem* 2002;277:30574-80.
75. Marko D, Puppel N, Tjaden Z, Jakobs S, Pahlke G. The substitution pattern of anthocyanidins affects different cellular signaling cascades regulating cell proliferation. *Mol Nutr Food Res* 2004;48:318-25.
76. Lee JM, Johnson JA. An important role of Nrf2-ARE *pathway* in the cellular defense mechanism. *J Biochem Mol Biol* 2004;37:139-43.
77. Chen C, Yu R, Owuor ED, Kong AN. Activation of antioxidant-response element (ARE), mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and caspases by major green tea polyphenol components during cell survival and death. *Arch Pharm Res* 2000;23:605-12.
78. Yu R, Jiao JJ, Duh JL, Gudehithlu K, Tan TH, Kong AN. Activation of mitogen-activated protein kinases by green tea polyphenols: potential signaling *pathways* in the regulation of antioxidant-responsive element-mediated phase II enzyme gene expression. *Carcinogenesis* 1997;18:451-56.
79. Kong AN, Yu R, Chen C, Mandlekar S, Primiano T. Signal transduction events elicited by natural products: role of MAPK and caspase *pathways* in homeostatic response and induction of apoptosis. *Arch Pharm Res* 2000;23:1-16.

80. Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang L-L, Scherer B, Sinclair DA. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 2003;425:191-96.
81. Brown ED, Morris VC, Rhodes DG, Sinha R, Levander OA. Urinary malondialdehyde-equivalents during ingestion of meat cooked at high or low temperatures. *Lipids* 1995;30:1053-56.
82. Gopaul NK, Zacharowski K, Halliwell B, Anggard EE. Evaluation of the postprandial effects of a fast-food meal on human plasma F2-isoprostane levels. *Free Radic Biol Med* 2000;28:806-14.
83. Grootveld M, Atherton MD, Sheerin AN, Hawkes J, Blake DR, Richens TE, Silwood CJL, Lynch E, Claxson AWD. *In vivo* absorption, metabolism, and urinary excretion of alpha ,beta -unsaturated aldehydes in experimental animals. Relevance to the development of cardiovascular diseases by the dietary ingestion of thermally stressed polyunsaturate-rich culinary oils. *J Clin Invest* 1998;101:1210-18.
84. Kanner J, Lapidot T. The stomach as a bioreactor: dietary lipid peroxidation in the gastric fluid and the effects of plant-derived antioxidants. *Free Radic Biol Med* 2001;31:1388-95.
85. Halliwell B, Zhao K, Whiteman M. The Gastrointestinal Tract: A Major Site of Antioxidant Action? *Free Radic Res* 2001;33:819-30.
86. Chamulitrat W. Activation of the superoxide-generating NADPH oxidase of intestinal lymphocytes produces highly reactive free radicals from sulfite. *Free Radic Biol Med* 1999;271:411-21.
87. van Lieshout EM, Posner GH, Woodard BT, Peters WH. Effects of the sulforaphane analog compound 30, indole-3-carbinol, D-limonene or relafen on glutathione S-transferases and glutathione peroxidase of the rat digestive tract. *Biochim Biophys Acta* 1998;1379:325-36.
88. Krul CAM, Zeilmaker MJ, Schothorst RC, Havenaar R. Intra-gastric formation and modulation of N-nitrosodimethylamine in a dynamic *in vitro* gastrointestinal model under human physiological conditions. *Food Chem Toxicol* 2004;42:51-63.
89. Graziani G, D'Argenio G, Tuccillo C, Loguercio C, Ritieni A, Morisco F, Del Vecchio Blanco C, Fogliano V, Romano M. Apple polyphenol extracts prevent damage to human gastric epithelial cells *in vitro* and to rat gastric mucosa *in vivo*. *Gut* 2005;54:193-200.
90. Gorelik S, Lapidot T, Shaham I, Granit R, Ligumsky M, Kohen R, Kanner J. Lipid peroxidation and coupled vitamin oxidation in simulated and human gastric fluid inhibited by dietary polyphenols: health implications. *J Agric Food Chem* 2005;53:3397-402.
91. Peri L, Pietraforte D, Scorza G, Napolitano A, Fogliano V, Minetti M. Apples increase nitric oxide production by human saliva at the acid pH of the stomach. A new biological function for polyphenols with a catechol group? *Free Radic Biol Med* 2005;39:668-81.
92. Tanaka K, Hayatsu T, Negishi T, Hayatsu H. Inhibition of N-nitrosation of secondary amines *in vitro* by tea extracts and catechins. *Mutat Res* 1998;412:91-8.

# UN MODELLO SPERIMENTALE DI IPOFUNZIONALITÀ COLINERGICA DURANTE LO SVILUPPO: EFFETTI COMPORTAMENTALI E NEUROCHIMICI

Maria Luisa Scattoni, Daniela Carnevale, Paola Piscopo, Gemma Calamandrei, Laura Ricceri  
 Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze

## Introduzione

La scoperta, alla fine del 1970, che i neuroni colinergici nel prosencefalo basale degenerano nella malattia di Alzheimer e che il grado di questa degenerazione è correlata con il grado di demenza, ha fortemente aumentato l'interesse sul ruolo dei meccanismi colinergici nell'apprendimento e nella memoria. Un numero crescente di studi ha utilizzato la somministrazione a livello cerebrale di neurotossine, eccitotossine (aminoacidi eccitatori analoghi e quelli prodotti dal neurone stesso), o colinotossine (ad esempio la etilcolina ione aziridinio, AF64A, (1)), per riprodurre, in modelli animali, la deplezione colinergica caratteristica di questo tipo di patologia. L'ultimo decennio ha visto la scoperta di un modo più selettivo di distruggere i neuroni colinergici del prosencefalo basale basato sulla coniugazione della citotossina saporina (estratta dalla pianta *Saponaria officinalis* L., *Caryophyllaceae*), con un anticorpo monoclonale (192 IgG) che si lega al recettore a bassa affinità per il fattore di crescita neuronale NGF (p75NGFr). Per la sua struttura molecolare, la molecola citotossica saporina non penetra facilmente la membrana cellulare, ma la sua coniugazione con un vettore di molecole (es. un anticorpo), in grado di legarsi specificatamente con un recettore presente sulle membrane, consente l'ingresso della tossina nella cellula e la rende inoltre selettiva per specifici sottotipi neuronali. L'immunotossina 192 IgG-saporina (192 IgG-Sap), infatti, è selettiva per i neuroni colinergici del prosencefalo basale in quanto tali neuroni esprimono abbondantemente il recettore p75NGFr. L'anticorpo monoclonale 192 IgG viene legato tramite un legame disolfuro alla citotossina saporina, e la risultante immunotossina (192 IgG-Sap), in seguito al legame con il recettore p75NGFr, è in grado di distruggere con successo i neuroni colinergici tramite l'inibizione della sintesi proteica. La saporina infatti appartiene alla classe di enzimi detti RIPs (*Ribosome Inactivating Proteins*); si tratta di enzimi espressi da un'ampia varietà di piante che sono in grado di catalizzare la scissione del legame N-glicosidico tra il ribosoma e l'adenina all'interno della sequenza conservata di rRNA 28S eucariotico. Il bersaglio adeninico è coinvolto nel legame delle proteine citoplasmatiche EF-1 ed EF-2, i cosiddetti fattori di allungamento, al ribosoma e quindi la tossina blocca l'allungamento della catena polipeptidica durante la traduzione (2). Le somministrazioni intracerebroventricolari di 192 IgG-Sap inducono una quasi completa e specifica distruzione delle afferenze colinergiche neocorticali e ippocampali tramite inibizione della sintesi proteica nei corpi cellulari dei neuroni che inviano tali afferenze.

Lo scopo della nostra ricerca è stato quello di studiare gli effetti comportamentali, neurofisiologici e molecolari della somministrazione intracerebroventricolare neonatale dell'immunotossina 192 IgG-Sap, a breve, medio e lungo termine dalla lesione. La nostra ipotesi è stata quella di considerare questo modello animale, con ridotti *input* colinergici alle regioni corticali e ippocampali già dalla prima settimana di vita postnatale, un valido modello sperimentale per valutare gli effetti di una ipofunzionalità colinergica precoce nei processi neuropatologici della malattia di Alzheimer e più in generale nei *deficit* cognitivi.

## Effetti a breve termine dell'ipofunzionalità colinergica neonatale

Per la valutazione degli effetti comportamentali a breve termine dell'ipofunzionalità colinergica sulle capacità di apprendimento e memoria del ratto è stato utilizzato il test di evitamento passivo (*passive avoidance*). Tale test inizialmente utilizzato in ratti adulti, è stato modificato per adattarlo alle competenze motorie e sensoriali di roditori prima dello svezzamento. Nel paradigma utilizzato (*step-through*), l'animale viene posto in un compartimento bianco, illuminato e deve inibire la sua spontanea tendenza ad entrare in un compartimento adiacente, nero e buio, dove riceve una leggera stimolazione elettrica avversiva (0.3 mA). Le capacità di acquisizione e memoria a 24 ore della risposta di evitamento misurate in questo test (ovvero tempi di latenza all'ingresso nel compartimento nero in prove successive, e il numero delle prove necessarie per raggiungere un prestabilito criterio di apprendimento) sono risultate sensibili a manipolazioni delle funzioni colinergiche del prosencefalo basale durante lo sviluppo (3-6).

Inizialmente è stata effettuata una singola somministrazione intracerebroventricolare di 192 IgG-Sap al primo giorno di vita postnatale (p1). Questo trattamento induce una significativa ipofunzionalità colinergica nella regione corticale ma non in quella ippocampale (riduzione del 18% in corteccia dell'attività catalitica dell'enzima colina-acetil-transferasi (ChAT), valido marcatore della funzionalità colinergica centrale). Tale trattamento non induce effetti comportamentali nel test di evitamento passivo a p15, né nel test di *open field* a p19 (7). Quando invece la somministrazione intracerebroventricolare di 192 IgG-Sap viene posticipata alla fine della prima settimana di vita postnatale (p7), si induce una riduzione molto più marcata della funzionalità colinergica in entrambe le regioni bersaglio delle proiezioni del prosencefalo basale (riduzione del 64% in corteccia e del 78% in ippocampo dell'attività della ChAT) accompagnate da un significativo deficit nell'apprendimento nel test di evitamento passivo (7). La maggior efficacia della lesione a p7 è probabilmente dovuta all'aumento dell'espressione dei recettori p75NGFr nel corso della prima settimana di vita postnatale (8, 9).

Accanto alla identificazione del deficit nell'acquisizione di una risposta di evitamento, sono stati inoltre caratterizzati effetti comportamentali dell'ipofunzionalità colinergica in altri *patterns* del repertorio comportamentale neonatale. Le somministrazioni di 192 IgG-Sap infatti producono: i) una significativa riduzione nel numero delle vocalizzazioni ultrasoniche indotte dall'isolamento del piccolo dalla madre a p9 e p11; ii) alterazioni nelle capacità di discriminazione olfattiva durante un test di *homing* a p13 (capacità di orientamento spaziale sulla base di odori provenienti dal nido), anch'esse in parte interpretabili come un deficit nelle capacità associative precoci (10).

Nel complesso tali risultati suggeriscono come all'induzione di una precoce ipofunzionalità dei neuroni colinergici del prosencefalo basale siano associati deficit cognitivi che, anche se di moderata entità, possono essere evidenziati con test comportamentali appropriati per le prime fasi dello sviluppo postnatale dei roditori (11). Recentemente *early-life cognitive limitations* (ECL) e *mild cognitive impairments* (MCI) sono state oggetto di studi epidemiologici in coorti di pazienti affetti da Alzheimer (12). Tali deficit cognitivi sono stati valutati come indici precoci di un anomalo sviluppo delle connessioni tra prosencefalo basale e regione corticale che poi durante l'invecchiamento, interagendo con altri fattori quali la deposizione di amiloide, anomalie microvascolari e aumento delle ROS (*reactive oxygen species*) (13) possono facilitare l'insorgere di processi neurodegenerativi (14).

## Effetti a lungo termine

Gli effetti comportamentali a lungo termine di una ipofunzionalità dei neuroni colinergici del prosencefalo basale sono stati più estesamente valutati utilizzando diversi paradigmi sperimentali da diversi laboratori. In generale, si è potuto analizzare il ruolo fisiologico dei neuroni colinergici del prosencefalo basale durante lo sviluppo. I primi studi in animali di due/tre mesi di età (giovani/adulti) nonostante documentino una persistente e marcata deplezione colinergica, mostrano solamente effetti comportamentali delle somministrazioni di 192 IgG-Sap di lieve entità. In particolare sono stati riscontrati deficit di memoria di lavoro (*working memory*) nel labirinto radiale (15), diminuita capacità di discriminazione spaziale nel test di open field con gli oggetti(16), e lievi o nulle alterazioni nel classico test del labirinto ad acqua (17, 18).

Nel complesso questi risultati suggeriscono che in ratti giovani/adulti (2/3 mesi di età) gli effetti della saporina su componenti cognitive del repertorio comportamentale dipendano fortemente dal tipo di test comportamentale utilizzato ed rimangono comunque di limitata entità.

Più recentemente (19) abbiamo valutato effetti a lungo termine comportamentali e neurochimici delle lesioni neonatali con la 192 IgG-Sap in ratti di sei mesi di età. In particolare abbiamo utilizzato un test comportamentale di memoria non spaziale, la trasmissione sociale delle preferenze alimentari. In questo test viene valutata una forma di memoria associativa non spaziale: durante il contatto sociale tra un ratto recentemente nutrito con un determinato cibo (dimostratore) e un conspecifico inesperto (osservatore), stimoli olfattivi del dimostratore vengono percepiti dall'osservatore determinando la preferenza di quest'ultimo per il cibo ingerito dal suo dimostratore (20, 21). Studi condotti da Galef *et al.* (20, 21) nell'ultimo decennio hanno fornito un quadro dettagliato dei meccanismi probabilmente responsabili di questo fenomeno e della sua rilevanza etologica.

I risultati di questo esperimento (Figura 1, grafico a sinistra) hanno mostrato come i ratti con lesioni selettive delle proiezioni colinergiche verso la neocorteccia e l'ippocampo mostrano deficit, a 4h e a 24h, nella preferenza alimentare socialmente trasmessa raggiungendo a 24h un livello di scelta casuale (50%, linea tratteggiata nel grafico); a 30 minuti dall'interazione con il dimostratore, invece, i ratti lesionati non mostrano alcuna differenza rispetto ai controlli e mostrano una significativa preferenza per il cibo consumato dal rispettivo dimostratore.

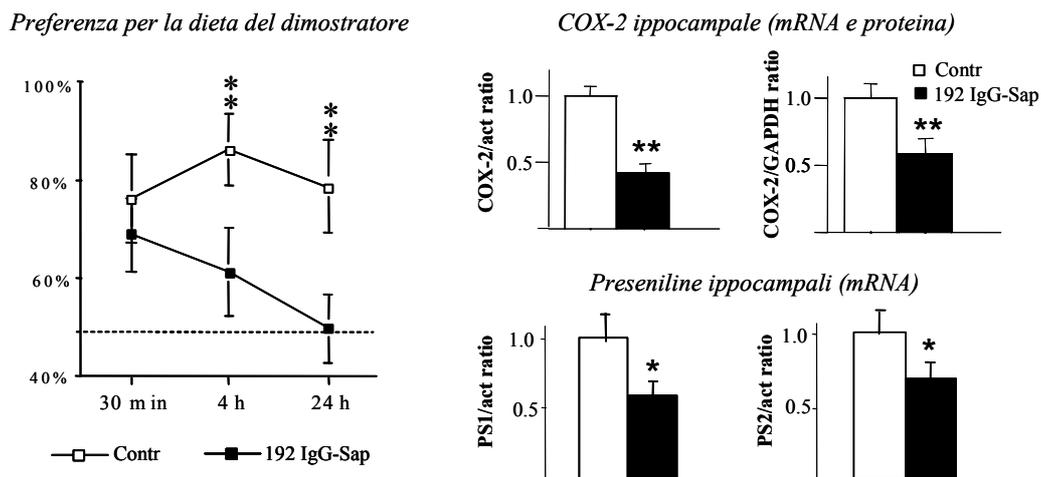


Figura 1. Effetti comportamentali e neurochimici in ratti con lesioni colinergiche neonatali.

In altri termini, in entrambi i gruppi si instaura correttamente la preferenza alimentare indotta dall'interazione con il dimostratore, ma questa non viene poi conservata negli animali lesionati. Il consumo totale di cibo durante lo stesso esperimento, come pure il consumo di cibo non familiare in un esperimento di neofobia alimentare condotto successivamente sugli stessi animali, fanno escludere effetti della lesione colinergica a livello di motivazione alimentare e/o avversione incondizionata a un cibo non conosciuto. Nel complesso quindi i dati comportamentali indicano come l'ipofunzionalità colinergica indotta dalla lesione neonatale induca un deterioramento della capacità mnemoniche in età adulta. Da un punto di vista metodologico questi dati suggeriscono come la trasmissione sociale delle preferenze alimentari, o altri test di memoria/riconoscimento di tipo sociale possano risultare più appropriati di quelli basati sull'orientamento spaziale per esaminare deficit cognitivi indotti da un'alterata funzionalità colinergica e con accorgimenti procedurali (quali ad esempio la riduzione del tempo di interazione tra dimostratore e osservatore) potrebbero consentire di valutare anche il ruolo di carichi attenzionali differenziali, in modo non avversivo, non spaziale ed etologicamente fondato.

## Valutazioni elettrofisiologiche e neurochimiche

Il deficit cognitivo evidenziato nel test comportamentale di trasmissione sociale delle preferenze alimentare è risultato inoltre associato, negli stessi animali, ad anomalie elettrofisiologiche e neurochimiche. Gli effetti elettrofisiologici della deafferenziazione colinergica, valutati mediante la registrazione dei tracciati elettroencefalografici (EEG) consistono, a livello corticale, in un potenziamento delle onde a bassa frequenza (d) e in una diminuzione delle onde ad alta frequenza (a e b), un *pattern* di alterazione assai simile a quello registrato in tracciati elettroencefalografici di pazienti affetti dalla sindrome di Alzheimer (22). Inoltre, abbiamo misurato i livelli di proteine la cui anormale espressione è stata associata con la neurodegenerazione, come la proteina del precursore amiloide (APP), le preseniline 1 e 2 (PS-1, PS-2), e le ciclossigenasi (COX-1 e COX-2) (vedi Figura 1). Mentre i livelli di APP (proteina e mRNA) non risultano alterati dopo la lesione colinergica neonatale, i livelli ippocampali della proteina COX-2 e il suo mRNA sono in media significativamente diminuiti ( $p < 0.01$ , vedi figura 1, grafico in alto a destra) mentre la proteina COX-1 resta inalterata, un tale quadro di diminuzione dei livelli di COX-2 è, in accordo con dati clinici recenti (23) che mostrano una sostanziale riduzione dei livelli di COX-2 neuronale, anche correlata al grado di deficit cognitivo dei pazienti. Anche per quanto riguarda i livelli di preseniline, (vedi Figura 1, grafico in basso a destra) i trascritti delle proteine PS-1 e PS-2 sono ridotti sia in ippocampo che in corteccia, ancora in accordo con dati clinici (24).

Nel complesso tali dati dimostrano come l'ipofunzionalità colinergica neonatale indotta da 192 IgG-Sap induca effetti a lungo termine di natura comportamentale elettrofisiologica e neurochimica. Tale modello sperimentale appare quindi un valido strumento per lo studio della vulnerabilità - indotta da un sviluppo anomalo della proiezioni colinergiche prosencefaliche a processi neuropatologici e di stress ossidativo associati al declino delle capacità cognitive e, possibilmente, alla malattia di Alzheimer.

## Ringraziamenti

L'attività di ricerca è stata finanziata dai progetti ISS n.4AN/F4 U.O.4, e ISS ALZ6. Ringraziamo Giovanni Dominici per l'assistenza tecnica.

## Bibliografia

1. Armstrong JN, Pappas BA. The histopathological, behavioral and neurochemical effects of intraventricular injection of ethylcholine mustard aziridinium (AF64A) in the neonatal rat. *Brain Res Dev Brain Res* 1991;61:249-57.
2. Savino C, Federici L, Ippoliti R, Lendaro E, Tsernoglou D. The crystal structure of saporin SO6 from *Saponaria officinalis* and its interaction with the ribosome. *FEBS Lett* 2000;470:239-43.
3. Calamandrei G, Pennazza S, Ricceri L, Valanzano A. Neonatal exposure to anti-nerve growth factor antibodies affects exploratory behavior of developing mice in the hole board. *Neurotoxicol Teratol* 1996;18:141-46.
4. Calamandrei G, Ricceri L, Valanzano A. Neonatal cocaine alters behavioural responsiveness to scopolamine and cholinergic development in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 1997;56:557-63.
5. Ricceri L, Tirassa P, Aloe L, Alleva E. Postnatal cocaine exposure affects neonatal passive avoidance performance and cholinergic development in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1993;45:283-89.
6. Ricceri L, Alleva E, Calamandrei G. Impairment of passive avoidance learning following repeated administrations of antibodies against nerve growth factor in neonatal mice. *Neuroreport* 1994;5:1401-04.
7. Ricceri L, Calamandrei G, Berger-Sweeney J. Different effects of postnatal day 1 versus 7 192 immunoglobulin G-saporin lesions on learning, exploratory behaviors, and neurochemistry in juvenile rats. *Behav Neurosci* 1997;111:1292-302.
8. Koh S, Higgins GA. Differential regulation of the low-affinity nerve growth factor receptor during postnatal development of the rat brain. *J Comp Neurol* 1991;313:494-508.
9. Eckenstein F. Transient expression of NGF-receptor-like immunoreactivity in postnatal rat brain and spinal cord. *Brain Res* 1988;446:149-54.
10. Scattoni ML, Puopolo M, Calamandrei G, Ricceri L. Basal forebrain cholinergic lesions in 7-day-old rats alter ultrasound vocalisations and homing behaviour. *Behav Brain Res* 2005;161:169-72.
11. Branchi I, Ricceri L. Transgenic and knock-out mouse pups: growing need for behavioral analysis. *Genes Brain Behav* 2002;1:135-41.
12. Snowdon J. Epidemiologic questions on mood disorders in old age. *Clin Neurosci* 1997;4:3-7.
13. Floyd RA, Hensley K. Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging* 2002;23:795-807.
14. Sarter M, Bruno JP. Developmental origins of the age-related decline in cortical cholinergic function and associated cognitive abilities. *Neurobiol Ageing* 2005;25:1127-39.
15. Sherren N, Pappas BA, Fortin T. Neural and behavioral effects of intracranial 192 IgG-saporin in neonatal rats: sexually dimorphic effects? *Brain Res Dev Brain Res* 1999;114:49-62.
16. Ricceri L, Usiello A, Valanzano A, Calamandrei G, Frick K, Berger-Sweeney J. Neonatal 192 IgG-saporin lesions of basal forebrain cholinergic neurons selectively impair response to spatial novelty in adult rats. *Behav Neurosci* 1999;113:1204-15.
17. Leanza G, Nilsson OG, Nikkhah G, Wiley RG, Bjorklund A. Effects of neonatal lesions of the basal forebrain cholinergic system by 192 immunoglobulin G-saporin: biochemical, behavioural and morphological characterization. *Neuroscience* 1996;74:119-41.
18. Ricceri L, Usiello A, Valanzano A, Calamandrei G, Frick K, Berger-Sweeney J. Neonatal 192 IgG-saporin lesions of basal forebrain cholinergic neurons selectively impair response to spatial novelty in adult rats. *Behav Neurosci* 1999;113:1204-15.

19. Ricceri L, Minghetti L, Moles A, Popoli P, Confaloni A, De Simone R, *et al.* Cognitive and neurological deficits induced by early and prolonged basal forebrain cholinergic hypofunction in rats. *Exp Neurol* 2004;189:162-72.
20. Galef BG, Jr., Whiskin EE. Socially transmitted food preferences can be used to study long-term memory in rats. *Learn Behav* 2003;31:160-64.
21. Galef BG, Jr., Wigmore SW. Transfer of information concerning distant foods: a laboratory investigation of the "information centre" hypothesis. *Animal Behav* 1983;31:748-58.
22. Dringenberg HC. Alzheimer's disease: more than a 'cholinergic disorder' evidence that cholinergic-monoaminergic interactions contribute to EEG slowing and dementia. *Behav Brain Res* 2000;115:235-49.
23. Yermakova AV, O'Banion MK. Downregulation of neuronal cyclooxygenase-2 expression in end stage Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2001;22:823-36.
24. McMillan PJ, Leverenz JB, Dorsa DM. Specific downregulation of presenilin 2 gene expression is prominent during early stages of sporadic late-onset Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 2000;78:138-45.

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN  
deve essere preventivamente autorizzata.  
Le richieste possono essere inviate a: [pubblicazioni@iss.it](mailto:pubblicazioni@iss.it).*

*Stampato da Tipografia Facciotti srl  
Vicolo Pian Due Torri 74, 00146 Roma*

*Roma, dicembre 2005 (n. 4) 16° Suppl.*