

UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Sede Consorziate: Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia

Dipartimento di Farmacologia ed Anestesiologia "Egidio Meneghetti"

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN: SCIENZE FARMACOLOGICHE

INDIRIZZO: FARMACOLOGIA, TOSSICOLOGIA E TERAPIA

CICLO 22°

**"I FLAVONOIDI COME FONTE DI SOSTANZE ANTIOSSIDANTI: STUDI SU COLTURE CELLULARI UMANE"**

**Direttore della Scuola** : Ch.mo Prof. Rosa Maria Gaion

**Coordinatore d'indirizzo** : Ch.mo Prof. Rosa Maria Gaion

**Supervisore**: Ch.mo Prof. Tiziana Rossi

**Supervisore esterno**: Ch.mo Prof. Cristina Magnoni

**Dottorando** : Stefania Giudice

***Dedicato a mio padre***

***“Il buio più terribile non è quello che ti circonda,  
ma quello che abita nel tuo cuore,  
e la luce più brillante non è quella che risplende  
fuori, ma quella che brilla nei tuoi occhi,  
l'unica che sale dal cuore.  
Lascia che questa luce ti conduca  
a compiere il tuo destino,  
e fidati del tuo istinto,  
non importa che cosa dicono gli altri.”  
Sergio Bambarén***

<b>Indice</b>	
<b>Riassunto</b>	pag. 4
<b>Summary</b>	pag. 6
<b>1. INTRODUZIONE</b>	pag. 8
1.1 Struttura della cute	pag. 9
1.2 Lo spettro delle radiazioni solari	pag. 14
1.2.1 Effetti degli UV sulla pelle	pag. 15
1.2.2 Azione genotossica dei raggi UV	pag. 19
1.2.3 UVB e risposta della cute: il ciclo cellulare	pag. 22
1.2.3.1 La regolazione del ciclo cellulare: p21	pag. 23
1.2.3.2 La proteina del retinoblastoma(pRb) e il ciclo cellulare	pag. 24
1.2.4 I geni onco-soppressori e la fotocarcinogenesi	pag. 26
1.2.5 p53, TSG e la fotocarcinogenesi	pag. 27
1.2.6 Profilo molecolare del gene p53	pag. 27
1.3 Apoptosi	pag. 29
1.3.1 Le principali pathways apoptotiche	pag. 32
1.3.1.1 Via estrinseca	pag. 32
1.3.1.2 Via intrinseca	pag. 34
1.3.1.2.1 Le proteine della famiglia Bcl-2	pag. 34
1.3.1.2.2 La proteina Bax	pag. 35
1.3.1.2.3 Il rilascio del citocromo C	pag. 36
1.3.1.3 Il ruolo delle caspasi nel programma apoptotico	pag. 36
1.4 Gli alimenti, i flavonoidi e la loro attività biochimica	pag. 39
1.5 L'uso dei foto protettori per la riduzione del danno cellulare	pag. 40
1.6 Scopo della tesi	pag. 45
<b>2. MATERIALI E METODI</b>	pag. 48
2.1 Sostanze testate	pag. 49
2.2 Colture di cheratinociti e melanociti umani normali	pag. 52
2.3 Test tossicologici: MTT Test (Methyl-Thiazole-Tetrazolium Test)	pag. 54
2.4 Test per la valutazione della formazione intracellulare di specie reattive dell'ossigeno (ROS)	pag. 54
2.5 Analisi del ciclo cellulare mediante citofluorimetria a flusso (FACS)	pag. 55
2.6 Western-blot	pag. 56
<b>3. RISULTATI</b>	pag. 58
3.1 Valutazione della tossicità dei flavonoidi su colture di cheratinociti e melanociti umani normali mediante test MTT	pag. 59
3.2 Valutazione dell'attività antiossidante dei flavonoidi su colture di cheratinociti e melanociti umani normali irradiati mediante test dei ROS	pag. 67
3.3 Il blocco del ciclo cellulare indotto dagli UVB viene riattivato in seguito al trattamento con kampferolo, acido 18 $\beta$ -glicirretinico e la glabridrina	pag. 76
3.4 Il kampferolo, l'acido 18 $\beta$ -glicirretinico e la glabridrina sono in grado di ridurre l'apoptosi indotta dagli UVB	pag. 81
<b>4. DISCUSSIONE</b>	pag. 86
<b>5. BIBLIOGRAFIA</b>	pag. 93

## Riassunto

La radiazione UV, in particolare la sua componente dovuta agli UVB, è un importante fattore implicato nella patogenesi dell'invecchiamento cutaneo e del cancro. Uno degli aspetti legato al danno indotto dagli UVB è la formazione dei dimeri di ciclobutano pirimidina e dei fotoprodotto pirimidina (6-4) pirimidone. Inoltre, le radiazioni UV sono in grado di indurre un danno indiretto al DNA attraverso un incremento dei livelli delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) che di conseguenza causano danno ossidativo reagendo con DNA, proteine, acidi grassi e zuccheri. Tali danni inducono diversi effetti avversi: disturbo del metabolismo cellulare, cambiamenti morfologici ed ultrastrutturali, attacco delle vie di regolazione e alterazioni nella differenziazione e proliferazione cellulare, apoptosi delle cellule cutanee.

Per evitare i danni indotti dalla radiazione UVB, sono stati presi in considerazione come agenti fotoprotettivi, fotocomposti e molecole antiossidanti. Negli ultimi anni molte ricerche hanno rivolto la loro attenzione alle molecole naturali estraibili dalle piante e caratterizzate da una elevata azione antiossidante. Si tratta di acidi fenolici, i flavonoidi e i polifenoli ad alto peso molecolare. In particolare è stato dimostrato che differenti composti naturali sono in grado di prevenire gli effetti e ridurre la severità del fotoinvecchiamento e le patologie cutanee indotte dagli UV. Nel presente studio sono stati investigati l'effetto antiossidante ed antiapoptotico di 45 fitoprodotto naturali in colture di cheratinociti e melanociti umani normali irradiati con raggi di tipo UVB.

Nella prima parte dello studio è stata valutata l'attività di queste molecole sui cheratinociti e melanociti umani normali. Le 45 sostanze sono state dapprima sottoposte *in vitro* al test MTT, per valutare l'eventuale attività citotossica. In seguito, sono stati esaminati gli effetti delle medesime molecole sulle cellule esposte radiazione UVB (50mJ/cm<sup>2</sup>).

In particolare è stato effettuato il saggio della 2'7'- diclorodiidrofluoresceina diacetato per determinare la formazione intracellulare di specie reattive dell'ossigeno (ROS). I risultati hanno evidenziato 3 molecole: il kampferolo, l'acido 18 $\beta$ -glicirretinico e la glabridrina caratterizzate da interessante attività protettiva in entrambe le linee cellulari testate.

Nella seconda parte di questo studio è stato valutato mediante western-blot e analisi del ciclo cellulare, il potenziale effetto antiapoptotico di questi tre composti nei cheratinociti e melanociti umani normali irradiati con raggi UVB.

I risultati mostrano che il pre-trattamento di cheratinociti e melanociti con questi fotocomposti inibisce l'arresto del ciclo cellulare normalmente mediato dagli UVB. Inoltre questo risultato è stato confermato attraverso l'analisi wester-blot dei livelli delle proteine p53 e p21.

Per meglio delucidare il meccanismo molecolare con cui i fotocomposti mediano l'apoptosi, sono state studiate le principali vie apoptotiche, estrinseca ed intrinseca. I risultati hanno confermato che il pre-trattamento dei cheratinociti e dei melanociti con questi fotocomposti inibisce l'apoptosi mediata dagli UVB coinvolgendo la down-regolazione di bcl-2 e di bid, il clivaggio delle caspasi -8 e -9 e di PARP.

La cute umana è costantemente esposta alle radiazioni UV emesse dai raggi solari. Queste possono indurre diversi cambiamenti cellulari con la possibilità di insorgenza di patologie anche gravi. Lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche e di prevenzione dipende sicuramente dall'approfondimento delle nostre conoscenze sul meccanismo molecolare del danno indotto dai raggi UV. I fitoprodotti identificati in questo lavoro presentano valide caratteristiche per un loro ulteriore sviluppo come molecole utilizzabili nella prevenzione degli effetti avversi indotti dalle radiazioni UV sulla pelle; tuttavia la conferma della suddetta attività richiede una scrupolosa valutazione clinica.

## Summary

UV radiation and in particular its UVB component, is an important environmental factor in the pathogenesis of skin aging and cancer.

One of the features of UVB-caused DNA damage is the formation of cyclobutane pyrimidine dimers and (6-4) photoproducts. Further, indirect DNA damage is also caused by increase in the level of reactive oxygen species (ROS) that cause oxidative damage reacting with DNA, proteins, fatty acids and saccharides. Such injuries result in a number of harmful effects: disturbance of cell metabolism, morphological and ultrastructural changes, alterations in the regulation pathways in differentiation, proliferation and apoptosis of skin cells. These processes can lead to photoaging and skin cancer development. In order to avoid UVB radiation damage, phytochemicals and antioxidants as photoprotectives has been considered. In recent years naturally occurring herbal compounds such as phenolic acids, flavonoids, and high molecular weight polyphenols have gained remarkable attention as strong protective agents. In particular different natural compounds prevent the occurrence and reduced the severity of UV-induced photoaging and diseases of the skin.

In the present study we have investigated the anti-oxidant and anti-apoptotic effect of forty-five phytochemicals in UVB-irradiated normal human keratinocytes and melanocytes.

In the first part of our study we assessed the activity of these compounds on UVB-irradiated normal human keratinocytes and melanocytes. These substances were submitted to a primary *in vitro* screening by MTT test in order to valuate proliferation rate. Subsequently, we examined in cultured epidermal cells the effects of UVB doses at 50mJ/cm<sup>2</sup>.

In particular 2',7'- dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF) assay was performed to determine formation of intracellular ROS. The results showed

that kaempferol, 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid and glabridin presented interesting properties in both cell lines tested.

In the second part of our study we investigated the antiapoptotic effects of these three compounds in UVB-irradiated normal human keratinocytes and melanocytes by western blot and cell cycle analysis. The results showed that pre-treatment of human keratinocytes and melanocytes with these phytochemicals inhibited UVB mediated cell cycle arrest. This result was confirmed by western blot analysis of p53 and p21 protein levels. To further elucidate the molecular mechanism of phytochemicals, we have decided to investigate the extrinsic and intrinsic apoptotic pathways.

The results showed that pre-treatment of human keratinocytes and melanocytes with these phytochemicals inhibited UVB mediated apoptosis through involvement of bcl-2 and bcl-xL protein, caspase-8 and -9, inhibition of PARP cleavage.

Human skin is constantly exposed to the UV radiation present in sunlight. This may induce a number of photobiological cellular changes. The development of novel preventive and therapeutic strategies depends on our understanding of the molecular mechanism of UV-damage. Phytochemicals that were identified may be candidates for prevention of adverse effects of UV radiation on the skin and evaluation of their clinical efficacy is awaited.

## 1. INTRODUZIONE

## 1.1 Struttura della cute

La cute è l'organo che ricopre l'intera superficie corporea, comportandosi da barriera protettiva nei confronti di stimoli provenienti dall'ambiente esterno e grazie alla fitta rete nervosa che possiede, rappresenta un importante organo di relazione. Essa è costituita da uno strato superficiale epiteliale, l'epidermide, e da uno strato profondo connettivale in cui si distinguono il derma e il tessuto sottocutaneo (Fig. 1).

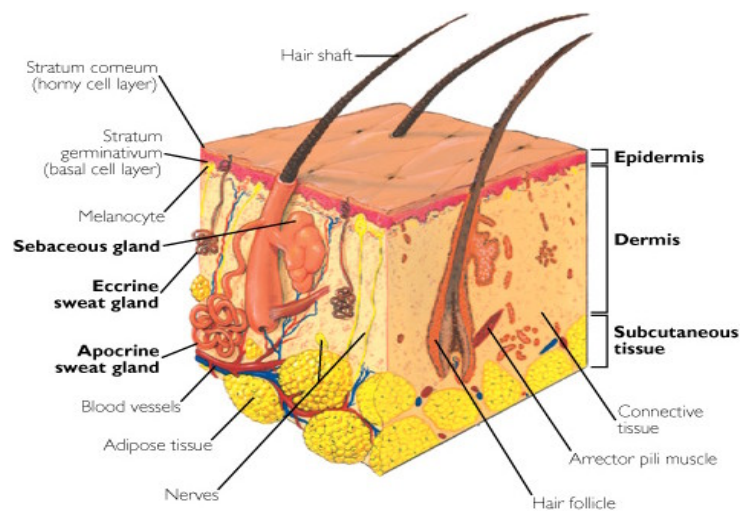


Fig.1: Principali componenti strutturali dell'epidermide.

L'epidermide è un epitelio cheratinizzante con spessore compreso fra 50µm e 1,5mm; non presenta una propria circolazione sanguigna, ma è rifornito di sostanze nutritive e strutturanti direttamente dai capillari dello strato sottostante che invece è riccamente vascolarizzato. Si tratta di un epitelio pluristratificato composto da quattro strati (Ribuffo, 1980):

- **lo strato basale o germinativo**, in genere formato da un solo strato di cellule (i cheratinociti basali) che presentano forma cuboidale con nucleo grande, ovale e ipercromatico con citoplasma ricco di ribosomi. Tali cellule si ancorano alla sottostante membrana basale per mezzo degli

emidesmosomi, mentre soltanto nella parte più alta della cellula i punti di contatto si differenziano in veri desmosomi.

- **lo strato malpighiano o spinoso**, formato da più strati di cellule che si ingrandiscono assumendo forma poligonale. A questo livello le cellule sono unite fra di loro da una fitta rete di interconnessioni di superficie, chiamate spine, che strutturalmente corrispondono ai desmosomi. Sono strutture lamellari simmetriche formate da due opposte membrane plasmatiche con componenti lamellari intracellulari. I tonofilamenti del citoscheletro si ancorano in prossimità dei desmosomi contribuendo alla stabilità di tale strato cellulare (Borradori et al., 1996; Green et al., 1996).
- **lo strato granuloso**, formato da 2-3 strati di cellule appiattite che a questo livello acquisiscono grandi granuli citoplasmatici di cheratoialina.
- **lo strato corneo** costituito da cellule eosinofile, di aspetto omogeneo, prive di nuclei.

In corrispondenza del palmo della mano e della pianta del piede si trova, tra lo strato granuloso e lo strato corneo, un altro strato detto lucido, dove le cellule si presentano di forma appiattita disposte in una o due filiere, nucleate, ma con citoplasma denso contenente eleidina, sostanza responsabile della rifrangenza alla luce di tali cellule.

Nell'epidermide sono presenti 4 tipi cellulari principali:

- **cheratinociti**: costituiscono il 95% della popolazione epidermica, producono la cheratina, una proteina fibrosa che conferisce all'epidermide proprietà protettive; i cheratinociti inoltre intervengono nelle reazioni immunitarie ed infiammatorie cutanee in quanto possiedono capacità di interazione con le cellule leucocitarie che vengono richiamate localmente in seguito ad un determinato stimolo;

- **melanociti:** si trovano nello strato basale dell'epidermide e sono cellule dendritiche in grado di sintetizzare la melanina; questo pigmento è contenuto all'interno di organuli citoplasmatici detti melanosomi, che migrano a livello dendritico e vengono trasferiti all'interno dei cheratinociti. L'insieme costituito dal melanocita e dal numero di cheratinociti che ricevono i melanosomi dallo stesso è chiamato "unità funzionale melanino-epidermica";
- **cellule di Langherans:** originano dal midollo osseo, si trovano nello strato sovrabasale dell'epidermide e svolgono funzioni di difesa e sorveglianza immunologica;
- **cellule di Merkel:** agiscono come recettori per il senso del tatto. Si tratta di cellule di forma ovale ricche di mitocondri, che hanno contatti sinaptici con gli afferenti somatosensoriali e sono localizzate nello strato basale dell'epidermide. Le cellule di Merkel sono i più semplici sensori di tatto e registrano la pressione esercitata sulla cute.

I diversi aspetti morfologici e citochimici che le cellule dei vari strati presentano non sono altro che espressioni delle tappe evolutive del processo di *cheratinizzazione* cui va incontro la cellula basale dello strato germinativo. I cheratinociti basali rappresentano infatti le cellule germinative dell'epidermide, dalla cui divisione dipende il continuo rinnovamento della stessa. Svolgono inoltre un ruolo molto importante nella costituzione delle GDE (giunzioni dermo-epidermiche), che separano il derma dall'epidermide e la cui porzione superiore è costituita dal polo basale della membrana cellulare dei cheratinociti. Sul versante epidermico della GDE sono presenti gli emidesmosomi che congiungono il citoscheletro alla membrana plasmatica (porzione citoplasmatica) ed interagiscono con i componenti della lamina lucida (nello spazio extracellulare). Lo strato basale dell'epidermide comprende due tipi cellulari: le cellule staminali e le "transient amplifying cells". Le prime

hanno capacità di dividersi illimitata, le seconde al contrario vanno incontro ad un numero limitato di cicli cellulari e di conseguenza sono destinate alla differenziazione terminale negli strati sovrabasali dell'epidermide.

La proliferazione dei cheratinociti verso la superficie cutanea determina la formazione dello strato granuloso. A questo livello le cellule acquisiscono grandi granuli citoplasmatici di cheratoialina. La parte più alta dello strato spinoso e lo strato granuloso contengono corpi lamellari chiamati "corpi di Odland". Il loro contenuto lipidico viene rilasciato fra i cheratinociti al limite fra lo strato granuloso e spinoso, contribuendo alla costituzione del film idrolipidico cutaneo, oltre che a giocare un ruolo importante nella funzione di barriera e nella coesione intercellulare con lo strato corneo.

Il successivo passo verso la maturazione consiste nella perdita del nucleo, acquisizione di forma piatta, citoplasma eosinofilo, perdita di organelli citoplasmatici e di desmosomi. I corneociti sono composti unicamente da filamenti di cheratina che si aggregano in grandi macrofibrille. Questi filamenti sono aggregati da una proteina contenuta nei granuli di cheratoialina chiamata flaggrina. Si attiva così la catena del processo di cheratinizzazione (Proksch et al., 2008), che ha una durata di 3-4 settimane, e che si conclude con la perdita delle cellule dalla superficie cutanea sottoforma di squame. In condizioni normali il numero delle cellule formate corrisponde a quelle perdute, assicurando così un costante spessore epidermico.

Esistono molti tipi di cheratine e ogni cellula epiteliale produce coppie di cheratine specifiche per quel tipo di epitelio. Involucrina e loricrina sono invece altre due proteine che agiscono a livello degli strati più superficiali dell'epidermide. L'involucrina è trasformata in fibra insolubile costituendo un involucro corneo all'interno della membrana plasmatica (Watt et al., 1983). La loricrina favorisce l'unione fra tale involucro e i filamenti di cheratoialina.

L'epitelio pluristratificato dell'epidermide ha quindi importanti funzioni biologiche nei confronti dell'ambiente esterno e di permeabilità selettiva nei confronti di sostanze esogene.

Il derma rappresenta lo strato più interno della pelle. Ha uno spessore di circa 1-2mm ed ha intimi rapporti con l'epidermide sostenendola, nutrendola ed offrendo sede alle appendici epidermiche (Briggaman et al., 1982). La sua funzione principale è quella di provvedere al nutrimento ed all'ossigenazione dell'epidermide. È costituito principalmente da due strati, lo strato papillare e lo strato reticolare. Il primo è costituito dalle papille e dallo strato sub-papillare, ha una vita metabolica molto attiva per la sua vicinanza all'epidermide. Il secondo strato può essere considerato come uno stroma fibroso con funzioni di sostegno meccanico. Costituenti del derma sono: le fibre collagene, argentofile ed elastiche, la sostanza fondamentale, alcuni tipi cellulari, i vasi sanguigni e linfatici, i nervi.

La cute svolge quindi importanti funzioni fisiologiche per l'uomo tra cui la possibilità di difenderci dagli stimoli provenienti dall'ambiente esterno come gli agenti atmosferici, gli agenti chimici e gli agenti meccanici. Tra questi le radiazioni solari rappresentano l'evento più pericoloso e i suoi principali bersagli sono sicuramente la pelle e gli occhi.

## 1.2 Lo spettro delle radiazioni solari

L'insieme delle radiazioni che costituiscono lo **spettro elettromagnetico** è suddiviso in (Fig. 2):

- **luce visibile:** lunghezze d'onda comprese tra i 380 e i 760 nanometri (nm),
- **raggi ultravioletti, raggi X e raggi gamma:** lunghezze d'onda minori di 380 nm,
- **radiazioni infrarosse, onde radio e microonde:** lunghezze d'onda maggiori di 760 nm.

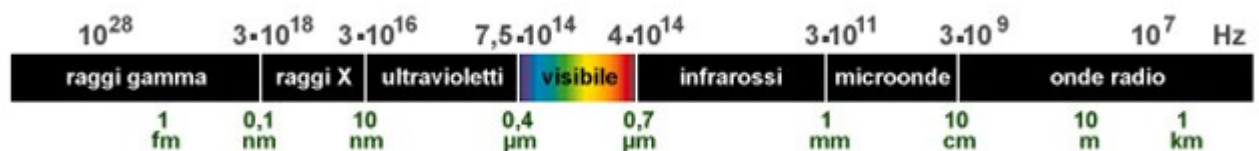


Fig.2: Lo spettro delle radiazioni solari.

La radiazione ultravioletta (radiazione UV) è quella porzione dello spettro elettromagnetico di lunghezze d'onda comprese tra 100 e 400 nm. Verso le lunghezze d'onda maggiori, la radiazione UV confina con la luce visibile di lunghezza d'onda più corta, percepita dall'uomo come viola, da cui la denominazione "radiazione ultravioletta" (Singh et al., 2005).

La radiazione UV è suddivisa in tre bande di differenti lunghezze d'onda chiamate UVA (400-315 nm), UVB (315-280 nm) e UVC (280-100 nm).

La principale sorgente naturale di radiazioni ultraviolette è rappresentata dal sole. L'atmosfera terrestre, tramite processi di assorbimento e diffusione, agisce come un filtro rispetto alle radiazioni provenienti dal sole. In particolare:

- la radiazione **UVC** (la più dannosa per la vita a causa del suo alto contenuto energetico) viene quasi completamente assorbita dall'ozono e dall'ossigeno degli strati più alti dell'atmosfera;
- la radiazione **UVB** viene anch'essa in buona parte assorbita, ma una non trascurabile percentuale (circa il 15-20%) riesce a raggiungere la superficie terrestre;
- la radiazione **UVA** riesce in buona parte (circa il 55-60%) a raggiungere la superficie terrestre.

### 1.2.1 Effetti degli UV sulla pelle

L'esposizione del corpo umano alla radiazione solare è un evento naturale e si può dire che gli organismi viventi abbiano raggiunto nel corso della loro evoluzione un delicato equilibrio tra effetti benefici e danni biologici prodotti dalla radiazione. Piccole dosi di radiazione UV sono infatti benefiche, mentre una eccessiva esposizione può avere conseguenze indesiderate per la salute. La condizione di esposizione ideale alla radiazione UV non è quindi l'assenza di esposizione bensì una "giusta" dose (Fig.3). Tale "giusta dose" varia in funzione dell'età, del sesso e del tipo di pelle.

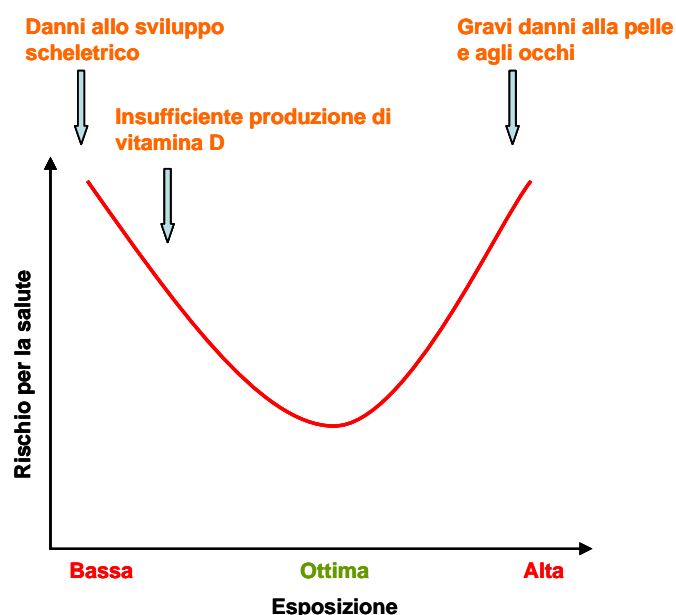


Fig. 3 Effetti delle radiazioni UV per la salute in funzione dell'esposizione.

Gi effetti benefici dell'esposizione a corrette dosi di radiazione UV possono essere ricondotti ai seguenti ambiti (Nguyen et al., 2009; Stinco et al., 2009):

- produzione di vitamina D (prevenzione dell'osteoporosi, del diabete tipo 1, delle malattie autoimmuni e di diversi tipi di tumori);
- produzione di serotonina (prevenzione depressione);
- effetto disinfettante (limitazione proliferazione batteri);
- terapie per patologie dermatologiche (cura di diverse patologie quali psoriasi, vitiligine, dermatite atopica);
- benessere termico e visivo.

Risulta quindi evidente che livelli eccessivamente bassi di esposizione rappresentano un rischio per la salute in relazione ad aspetti di notevole importanza.

Esposizioni intermittenti e prolungate nel tempo, soprattutto in soggetti caratterizzati da fototipo cutaneo chiaro generano invece la manifestazione di reazioni negative sull'organismo. Queste vengono distinte in:

- acute,
- tardive.

**Le reazioni acute** compaiono dopo poche ore dall'esposizione solare. L'azione della radiazione UV sull'epidermide porta alla liberazione di sostanze (mediatori) che causano vasodilatazione ed eritema. E' solo a distanza di alcuni giorni che si ha un aumento della pigmentazione cutanea dovuta alla stimolazione della produzione di melanina da parte dei melanociti; tale reazione è da considerarsi un meccanismo di difesa della cute nei confronti dell'azione degli UV. L'eritema solare, cioè l'arrossamento della pelle determinato dall'effetto combinato della dilatazione dei vasi capillari e da una reazione infiammatoria protratta, può trasformarsi in ustione. L'ustione è determinata sia dagli UVB che dagli UVA; benché per questi ultimi sia

necessaria una dose di esposizione 1000 volte superiore a quella degli UVB, dato il predominante contributo degli UVA allo spettro solare al suolo, si ritiene che essi siano responsabili di almeno il 15% della reazione eritematosa (Bajdik et al., 1996). L'abbronzatura, il cui scopo naturale è proteggere la pelle, è più rapida e meno intensa nella sua componente dovuta agli UVA, più duratura nella componente prodotta dagli UVB. Altri effetti precoci legati all'esposizione alla luce solare sono rappresentati dalla comparsa di intenso bruciore agli occhi accompagnato da lacrimazione e sensazione di fastidio (fotofobia) causati da infiammazione della cornea e della congiuntiva. Un altro effetto di adattamento meno evidente è costituito dall'ispessimento degli strati superficiali della pelle che attenua la penetrazione dei raggi UV negli strati più profondi. Ambedue le risposte sono un segno di danno alla pelle. Negli individui la soglia dell'eritema e la capacità di adattamento all'esposizione UV variano notevolmente a seconda del fototipo (Grossman et al., 1995).

Tra gli **effetti tardivi** devono invece essere ricordati i fenomeni di invecchiamento precoce della cute, con perdita di elasticità, comparsa di rughe e pelle secca (Sjerobabski et al., 2008; Farage et al., 2008). Fenomeni di maggiore importanza sono rappresentati dalla comparsa di tumori cutanei, tra cui in particolare i carcinomi e il melanoma. I tumori della pelle non melanocitari (NMSC, acronimo di Non Melanoma Skin Cancer) comprendono il carcinoma basocellulare (Goldberg et al., 1996) o basalioma e il carcinoma squamoso (Gray et al., 1997) o spinocellulare. Questi tumori sono raramente letali ma il trattamento chirurgico può risultare deturpante. Il carcinoma della pelle si manifesta più frequentemente sulle parti del corpo che sono solitamente esposte al sole come le orecchie, il viso, il collo e gli avambracci. Questo implica che il principale fattore causale è l'esposizione alla radiazione UV ripetuta e di lungo periodo.

Il melanoma maligno (MM), sebbene molto meno diffuso del carcinoma, rappresenta la causa più frequente di morte per cancro della pelle. Dai primi anni '70, l'incidenza del MM è significativamente aumentata (in media del 4% all'anno negli Stati Uniti). Numerosi studi mostrano una correlazione fra il rischio di melanoma e le caratteristiche genetiche dell'individuo e il suo comportamento nell'esposizione alla radiazione UV (Gruber et al., 2008). Tra i principali fattori di rischio per il MM nell'uomo c'è la presenza di un numero elevato di nevi atipici soprattutto nella popolazione di pelle chiara. Anche esposizioni intermittenti e molto intense alle radiazioni UV solari sembrano costituire un significativo fattore di rischio per lo sviluppo del MM.

Anche l'occhio può essere oggetto di effetti a lungo termine: a distanza di tempo, infatti, può manifestarsi la comparsa di malattie tra le quali l'opacizzazione del cristallino (cataratta), la fotocheratite e la fotocongiuntivite. Tali reazioni infiammatorie, che normalmente appaiono poche ore dopo l'esposizione, sono analoghe all'eritema, con la differenza che si manifestano su tessuti epiteliali molto sensibili quali quelli del bulbo oculare (cornea) e delle palpebre (congiuntiva). Entrambe possono essere molto dolorose, ma sono reversibili e non provocano danni permanenti agli occhi o alla vista (Moan et al., 2008).

Legato sia agli effetti a breve termine che a quelli a lungo termine è l'effetto immunodepressivo. C'è infatti una crescente evidenza che sia l'esposizione acuta, sia l'esposizione cronica alla radiazione UV possano indurre un sistematico effetto immunodepressivo. Largamente incomplete sono però le evidenze sul fatto che questo si traduca in un effetto sanitario significativo.

### 1.2.2 Azione genotossica dei raggi UV

La radiazione ultravioletta è caratterizzata da livelli energetici insufficienti a ionizzare atomi e molecole ma sufficienti a rompere i legami molecolari. I raggi UVB in particolare sono in grado di indurre danni al patrimonio genetico delle cellule a causa dell'assorbimento da parte del DNA delle radiazioni UV. Tra le modificazioni indotte dai raggi UV nel DNA, negli ultimi anni sono stati identificati diversi fotoprodotti (Matsui et al., 1995). Il fotoprodotto più comune è costituito dalla dimerizzazione di due basi pirimidiniche adiacenti che aprono i doppi legami tra C-5 e C-6 in ogni base costituendo nuovi legami covalenti tra C-5 e C-6 di ogni base con formazione di una struttura ad anello ciclobutanico. Due basi pirimidiniche adiacenti possono inoltre dare luogo ad un secondo fotoprodotto, il pirimidina (6-4) pirimidone. In questo caso i raggi UV aprono i legami in C-5 – C-6, uno degli anelli pirimidinici ruota e il suo C-4 forma un legame con il C-6 dell'altro anello. Questi fotoprodotti interferiscono con l'omeostasi cellulare causando un blocco replicativo, e se non vengono riparati causano mutazioni nel sito di lesione (Fig. 4).

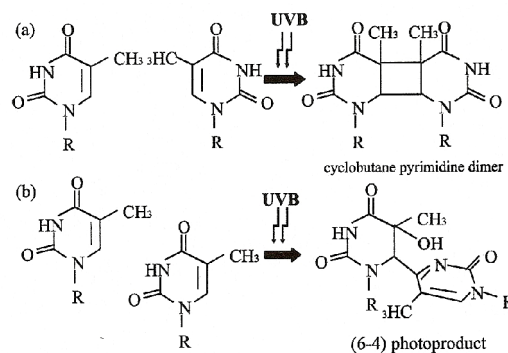


Fig. 4: Effetti delle radiazioni UVB sul DNA.

Le mutazioni generate dai raggi UV conseguenti ad un errato riparo dei fotoprodotti sono specifiche e ben identificabili, localizzate a livello di siti di pirimidinici (cioè in siti dove un nucleotide C o T è associato ad un altro C o T) e sono prevalentemente transizioni G-T e nel 5-10% dei casi mutazioni tandem CC-TT. Ad esempio quando la radiazione UV colpisce un filamento di DNA, è possibile che due timine consecutive ne assorbano l'energia per formare un legame covalente. Si ha quindi la formazione di un dimero della timina, una lesione grave del DNA che altera l'informazione genetica (Fig. 5).

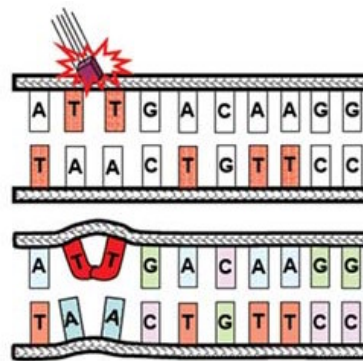


Fig. 5: Formazione di un dimero della timina.

Quando queste mutazioni sono localizzate a livello di geni con attività tumor suppressor come p53 o protooncogeni possono dare inizio al processo di trasformazione neoplastica (Cao et al., 2009). Gli organismi viventi hanno tuttavia un meccanismo naturale di difesa, la fotoriparazione enzimatica. L'enzima DNA polimerasi scopre la lesione, l'enzima DNA fotoliasi si porta sul dimero, assorbe un fotone e usa la sua energia per sciogliere il legame covalente.

L'efficienza di questo meccanismo varia naturalmente da specie a specie e, all'interno della stessa specie, da individuo a individuo. Quando questo meccanismo di difesa non agisce in modo appropriato o sufficiente, si genera un danno genetico (Daya – Grosjean et al., 1995).

I raggi UV, ed in particolare i raggi UVA sono anche in grado di danneggiare le cellule attraverso la formazione di radicali reattivi dell'ossigeno (ROS) con un meccanismo indiretto provocato dall'assorbimento dei fotoni da parte di un fotosensibilizzante sconosciuto (Fguyer et al., 2003). I ROS sono le specie reattive a maggior diffusione. Questi possono formarsi spontaneamente per reazione diretta dell'ossigeno molecolare con cationi (generalmente ferro) non chelati presenti nel circolo sanguigno, nell'interstizio cellulare o nei fluidi intracellulari, o enzimaticamente, mediante appunto l'enzima NADPH ossidasi, per poi andare incontro ad una serie di reazioni biochimiche. Tra i ROS, il radicale ossidrile (OH<sup>•</sup>) in particolare, ampiamente prodotto in seguito a esposizione a UVA oltre all'ossidazione, carbonilazione dei residui amminoacidici e perossidazione dei lipidi di membrana è capace sia di sottrarre elettroni alle basi azotate e al deossiribosio sia di aggiungere elettroni alle basi con la conseguente produzione di radicali liberi che possono determinare diversi tipi di danni al DNA come la rottura dei filamenti o la generazione di mutazioni (Matsui et al., 1995). Di conseguenza si ritiene che questo danno dato dai ROS al DNA possa alterare i processi della cascata apoptotica e possa essere coinvolto nella patogenesi di alcune patologie cutanee tra cui le fotodermatiti e i tumori cutanei.

Negli ultimi anni per potenziare i sistemi di difesa naturali verso i ROS e i raggi UV diretti è stato introdotto l'uso della somministrazione di fotoprotettori che possono prevenire il danno cellulare inibendo l'infiammazione cutanea e riducendo il numero delle cellule apoptotiche (Filip et al., 2009).

### 1.2.3 UVB e risposta della cute: il ciclo cellulare

A livello cutaneo le radiazioni UVB determinano l'incremento dell'espressione di p53 con conseguente arresto della progressione nel ciclo cellulare ed eventuale apoptosi.

Il ciclo cellulare è l'intervallo di tempo che intercorre tra il completamento della mitosi di una cellula parentale e il completamento della successiva mitosi di una cellula figlia. È caratterizzato da 4 fasi principali M, G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> (Han et al., 2009) (Fig. 6).

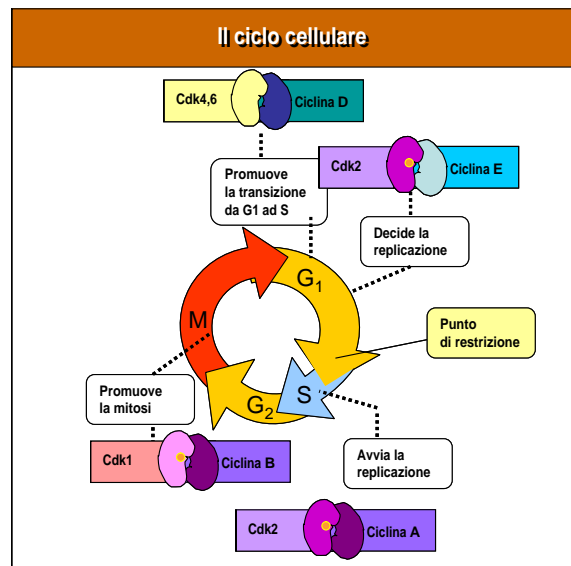


Fig. 6: Rappresentazione schematica del ciclo cellulare.

La **fase M** o fase di mitosi è caratterizzata da condensazione, orientamento, segregazione e ricondensazione dei cromosomi che attraverso 4 sottofasi garantiscono una uguale ripartizione di materiale genetico nelle due cellule figlie.

La **fase G<sub>1</sub>** è la fase più lunga del ciclo in cui si ha sintesi di RNA e proteine.

La **fase S** è la fase di replicazione del DNA in cui aumenta la sintesi degli enzimi coinvolti nel metabolismo degli acidi nucleici ( timidina chinasi, DNA polimerasi

e diidrolato reduttasi). Essi si associano in un complesso multienzimatico detto replicasi che si muove dal citoplasma verso il nucleo.

La **fase G<sub>2</sub>** è la fase in cui vengono sintetizzate tutte le proteine indispensabili per la divisione cellulare.

A livello del ciclo cellulare sono presenti due check point (punti di restrizione) fondamentali il cui superamento è necessario per progredire dalla fase G<sub>1</sub> a S e dalla fase G<sub>2</sub> a M.

Quando la cellula subisce un danno si blocca a livello di uno dei check point cercando di ripararli e decidere se andare nello stato proliferante o se invece andare in una fase detta G<sub>0</sub>, cioè in quiescenza.

La **fase G<sub>0</sub>** è la fase post-mitotica in cui le cellule hanno una condizione di quiescenza reversibile. Hanno attività metabolica ridotta e assenza di attività proliferativa. Non proliferano ma a seguito di stimoli mitogeni possono rientrare in fase G<sub>1</sub> e proliferare. Nel caso in cui i danni non vengano riparati la cellula è in grado di attivare un programma di morte cellulare programmata detto apoptosi.

### **1.2.3.1 La regolazione del ciclo cellulare: p21**

Un importante ruolo per l'arresto del ciclo cellulare in fase G<sub>1</sub> (Cazzalini et al., 2010) è dato da p21, una proteina di 21kDa, conosciuta anche come p21/WAF1 (Wild-type-p53 Activated Fragment 1). p21 gioca un ruolo importante durante la crescita cellulare e il differenziamento; è una proteina p53-inducibile che inattiva i complessi ciclina/CDK, bloccando la progressione del ciclo cellulare nella transizione tra fase G<sub>1</sub> e S, permettendo così alla cellula di riparare eventuali mutazioni accumulate nel DNA. p21 è anche espressa durante l'apoptosi indotta sia con un meccanismo p53-dipendente sia p53-indipendente. Interagisce inoltre con PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen),

un fattore essenziale di replicazione del DNA che, legandosi alla proteina hFen1, permette la maturazione del filamento di DNA appena sintetizzato. Se PCNA è legato da p21, la sua interazione con hFen1 è impedita e il DNA appena sintetizzato non può maturare correttamente.

### 1.2.3.2 La proteina del retinoblastoma (pRb) e il ciclo cellulare

p53 promuove la trascrizione del proto-oncogene pRb, un eterodimero formato da una proteina di 193 aminoacidi e una di 140 aminoacidi. pRb interagisce con la famiglia dei fattori trascrizionali E2F, che fanno entrare la cellula nella fase di sintesi del DNA, cioè la fase S (Poznic et al., 2009). La parte responsabile del contatto con E2F è la regione C-terminale, chiamata "pocket domain". Le  $\alpha$ -eliche in questo dominio sono responsabili del mantenimento della giusta configurazione per il legame a E2F. Quando pRb è legato a E2F, l'attività di quest'ultimo è inibita Fig. 7.

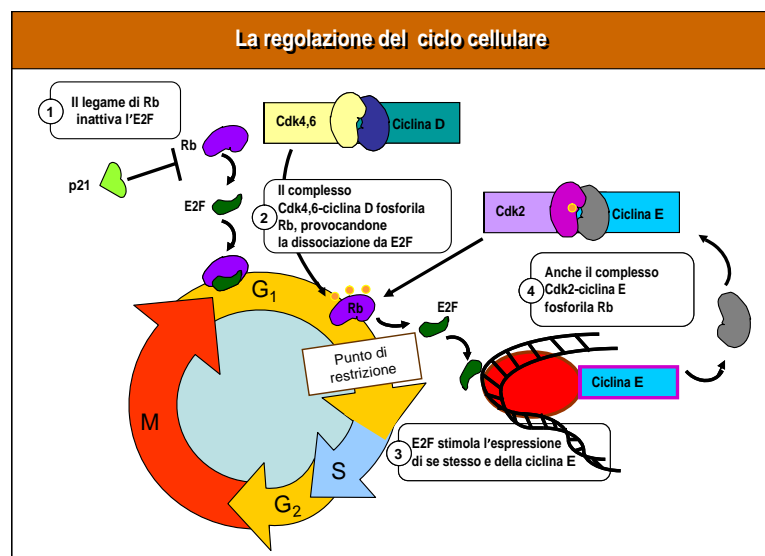


Fig. 7: La regolazione del ciclo cellulare e le proteine pRb e p21.

Se una cellula viene stimolata da fattori di crescita, una cascata enzimatica attiva Ras, il quale a sua volta porta alla produzione delle cicline della fase G<sub>1</sub>,

più precisamente porta alla formazione dei complessi ciclina D/CDK. Questi esplicano la loro funzione fosforilando proteine chiave del ciclo cellulare, nel nostro caso pRb.

Una volta che pRb è fosforilata non può più legare E2F, che quindi può indurre la trascrizione di geni coinvolti nell'avanzamento del ciclo cellulare. Nella fase G<sub>1</sub> pRb non è fosforilato ed è legato a E2F; successivamente pRb viene fosforilata dal complesso ciclina D/CDK e perde la capacità di legarsi a E2F. pRb rimane nello stato fosforilato per tutto il resto del ciclo cellulare fino a che, durante la fase M, viene defosforilato e torna a legarsi a E2F. La produzione di nuovi pRb in risposta all'azione di p53 impedisce quindi che i fattori di trascrizione E2F, resi liberi dalla fosforilazione delle proteine pRb già presenti nella cellula, inizino la trascrizione di geni implicati nell'avanzamento del ciclo cellulare. L'azione è quindi opposta a quella dei fattori di crescita.

## 1.2.4 I geni onco-soppressori e la fotocarcinogenesi

I geni onco-soppressori (Tumor Suppressor Genes, TSGs) regolano la crescita delle cellule normali e la loro differenziazione. L'elusione delle cellule dai loro effetti regolatori è correlata con l'evoluzione delle neoplasie e la loro successiva progressione (Kanellou et al., 2009).

Quando una singola copia di TSGs è danneggiata, la copia superstite è solitamente in grado di mantenere la funzione cellulare normale nonostante anche l'allele superstite in questione, potrebbe essere distrutto dalle mutazioni inattive. Questo suggerisce che comunque sono necessari due eventi genetici per l'inattivazione del TSGs.

Nella carcinogenesi sono coinvolti diversi TSGs, tra questi i geni *p53* (SOCs e BCCs) (Brown et al., 2009), *p16* (melanoma), e *PTCH* (BOCs e possibilmente SOC). Gli UVR turbano la sequenza genica governata da queste molecole (Fig. 8).

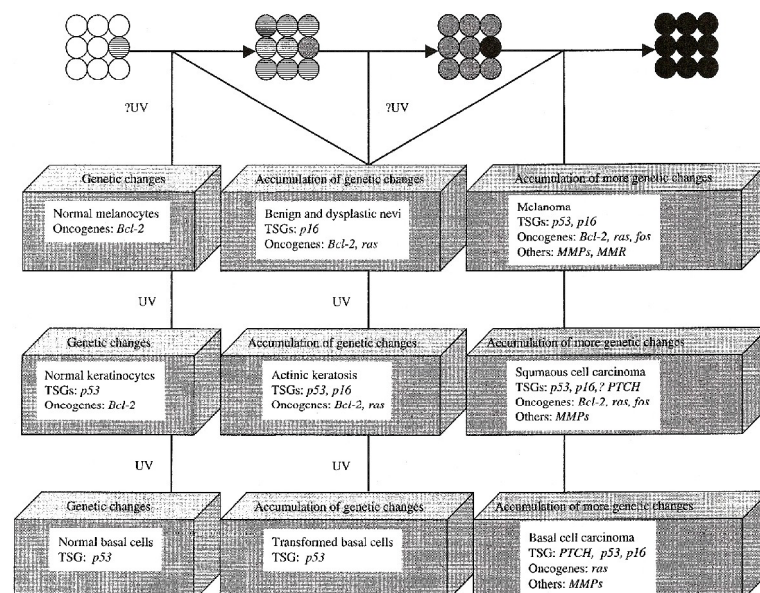


Fig. 8: Carcinogenesi cutanea basata sulle alterazioni geniche indotte dalle radiazioni UV.

### 1.2.5 p53, TSG e la fotocarcinogenesi

p53 è un fattore trascrizionale coinvolto nel mantenimento della stabilità genomica poiché induce sia l'apoptosi, sia il blocco del ciclo cellulare. La perdita di funzione di p53 è correlata con la trasformazione *in vitro* e lo sviluppo di neoplasie *in vivo*. Nell'uomo, i difetti del gene p53 sono coinvolti in più del 50% dei tumori maligni, ivi inclusi il melanoma ed i tumori della pelle non-melanomatosi. L'inattivazione del gene p53 può essere il risultato di mutazioni puntiformi, delezioni e mutazioni da inserzione.

### 1.2.6 Profilo molecolare del gene p53

p53 è un gene *stress-response* che codifica per una proteina nucleare onco-soppressiva di 53kDa che ha un ruolo centrale nella regolazione della crescita cellulare, nel riparo del DNA e nell'induzione dell'apoptosi (Boehme et al., 2009). La proteina p53 è un tetramero che si accumula nel citoplasma durante la fase G<sub>1</sub> (GAP 1) del ciclo cellulare, e che migra nel nucleo all'inizio della fase S di sintesi. Ha più di 7 differenti proprietà funzionali, può attivare 20 diversi *promoters*, può reprimere 26 differenti *promoters* ed *enhancers*, e può interagire con più di 35 proteine cellulari e virali. Inoltre, il gene p53 è un punto cruciale che detta il destino finale della cellula. La proteina infatti è in grado di individuare un danno ed arrestare il ciclo cellulare in fase G<sub>1</sub>, in modo da permettere alla cellula di correggere l'errore. Se però il danno al DNA è ingente e la cellula non è in grado di ripararlo, p53 dà inizio al processo apoptotico, in modo che le mutazioni accumulate non vengano trasmesse alle cellule figlie durante la mitosi, prevenendo così la formazioni di cellule tumorali.

In una cellula normale i livelli di p53 sono molto bassi, visto che questa proteina non è necessaria per il normale sviluppo; topi transgenici knock-out per il gene di p53 appaiono normali tranne che in un unico aspetto: sviluppano tumori

precocemente. I livelli di p53 aumentano invece quando la cellula è sottoposta a stress, come nel caso di esposizione a raggi UV (Fig. 9) o in caso di ipossia. In ogni modo, gli alti livelli di p53 operano per limitare i possibili danni (de Griijl et al., 2009).

In seguito all'esposizione agli UVR o allo stress ossidativo, viene quindi indotta l'attività del gene p53. La quantità della proteina p53 aumenta rapidamente bloccando l'espressione dei geni "effettori" e quindi le cellule si arrestano nella fase G<sub>1</sub>. L'attivazione dei sistemi di riparo o del programma di apoptosi dopo danno cellulare, dipende da uno o più segnali di trasduzione e vi sono evidenze sperimentali che indicano che il DNA danneggiato è in grado di produrre uno di questi segnali. Il segnale viene captato dai regolatori del ciclo cellulare o dell'apoptosi che danno inizio alla trascrizione genica con accumulo di proteine appartenenti a diverse classi funzionali.

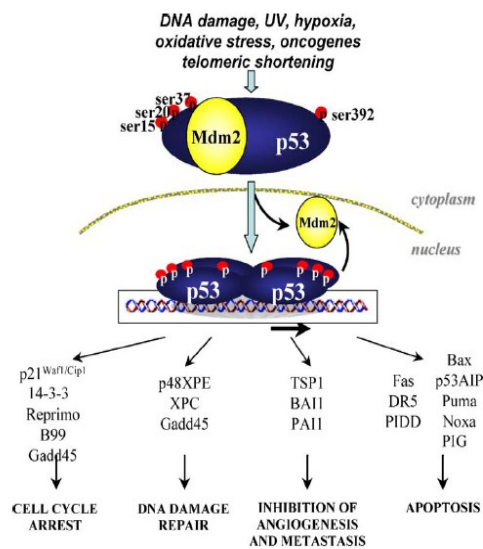


Fig. 9: Attivazione del gene p53 dopo esposizione a raggi UV.

### 1.3 Apoptosi

La divisione, il differenziamento e la morte di una cellula sono eventi strettamente regolati in ogni organismo e, nell'individuo adulto, la perdita di singole cellule riveste un ruolo primario nel mantenimento dell'omeostasi tissutale. Si ritiene infatti che, nell'organismo umano, diversi milioni di cellule muoiano ogni secondo e che tale processo venga bilanciato dalla produzione di nuove cellule. Per questo ed altri motivi, tra cui il ruolo nello sviluppo embrionale, la morte cellulare viene oggi considerata come un vero e proprio processo fisiologico, soggetto a rigorosi e complessi meccanismi di controllo. Un'alterazione di tali meccanismi promuove, inevitabilmente, diverse condizioni patologiche.

L'apoptosi è un meccanismo di eliminazione cellulare altamente evoluto e conservato, che risponde a stimoli omeostatici e morfogenetici. Le cellule possiedono un programma genetico di morte cellulare, controllato a livello trascrizionale (Gobè et al., 2001). Per l'organismo, l'apoptosi rappresenta un vantaggioso meccanismo di delezione cellulare. La cellula si stacca dalle cellule adiacenti per la perdita delle giunzioni intracellulari, che determinano la vita di gruppo del clone e ne avvia l'autodistruzione in essi programmata. L'apoptosi coinvolge generalmente singole cellule e non è mai accompagnata da fenomeni infiammatori, in quanto non si verifica fuoriuscita di materiale cellulare. Gli eventi morfologici e biochimici che intervengono nell'apoptosi si possono così riassumere (Kerr et al., 1972):

- **alterazioni nucleari:** sebbene la membrana nucleare rimanga intatta, i pori nucleari vengono ridistribuiti, probabilmente come risultato della proteolisi delle lamine. Le lamine sono filamenti proteici intermedi che costituiscono un reticolo a supporto della membrana nucleare interna, la cui funzione è di riorganizzare la cromatina con il nucleolo in interfase. Il divaggingo delle lamine è un evento precoce dell'apoptosi, è attuato da proteasi appartenenti alla

famiglia delle caspasi, in particolare la caspasi-3. La cromatina nucleare si condensa, così come il nucleo, e viene spostata a ridosso della superficie interna della membrana nucleare; tutto ciò sembra avvenire per la degradazione di alcune proteine nucleari. Tra queste ricordiamo le già citate lamine, la poli-adenosina-difosfato-ribosio-polimerasi (PARP), le topoisomerasi, l'actina globulare, la subunità catalitica della chinasi DNA dipendente, e la proteina U1-70Kd. Il nucleo infine si frammenta in diversi elementi che verranno poi rivestiti dalla membrana citoplasmatica con la formazione dei corpi apoptotici (Zhu et al., 2004).

- **degradazione del DNA:** nel nucleo il DNA è associato agli istoni a formare i nucleosomi, che sono separati tra loro da regioni internucleosomali o DNA linker composte da circa 200 paia di basi. Queste regioni sono i siti d'azione delle endonucleasi cellulari che degradano il DNA in tre possibili modalità. Il tipo classico di degradazione consiste in un divaggio del DNA a formare oligonucleosomi di 180-200 paia di basi (bp). Un'altra possibile modalità di degradazione del DNA è stata messa in luce grazie all'analisi del divaggio del DNA mediante l'elettroforesi "pulse field"; sono stati infatti ritrovati frammenti di 30-50Kb, che presumibilmente, si identificano nei loops della cromatina nucleare. Una terza variante di degradazione del DNA genera frammenti di circa 300Kb, che non sono comunque frequentemente osservabili nel corso dell'apoptosi (Zhu et al., 2004). L'endonucleasi maggiormente implicata nel divaggio del DNA è stata recentemente individuata nella "Caspasi-activated DNase" (CAD) che si trova normalmente complessata con il suo inibitore ICAD; quando, nel corso dell'apoptosi, la caspasi-3 separa questi due elementi, CAD è libera di agire frammentando il DNA.
- **alterazioni della membrana cellulare:** in corso di apoptosi la cellula perde i contatti con la matrice extracellulare e le cellule adiacenti, assumendo così una forma più sferica. Si verifica poi il "blebbing", cioè la formazione di strutture

simili a bolle a livello della membrana cellulare, e la fusione delle cisterne più periferiche del reticolo endoplasmatico con la membrana stessa. Nelle ultime fasi dell'apoptosi la fosfatidil-serina viene traslocata sulla superficie esterna della membrana cellulare, dove permetterà alle cellule macrofagiche di riconoscere e fagocitare i corpi apoptotici, evitando così la flogosi (Zhu et al., 2004).

- **alterazioni mitocondriali:** uno degli eventi più precoci dell'apoptosi è la perdita del potenziale transmembrana del mitocondrio, un gradiente elettrochimico dovuto alla disposizione asimmetrica di idrogenioni ed altri ioni presenti sul versante interno della membrana mitocondriale. Diversi autori hanno dimostrato che questo evento precede la frammentazione del DNA e la traslocazione dei residui di fosfatidil-serina. La causa della perdita di potenziale è la compromissione del mega-canale PTPC (permeability transition pore complex), che comporta un aumento della permeabilità transmembranale. Vengono così rilasciate nel citoplasma numerose proteine tra cui il citocromo c e "apoptosis inducing factor" (AIF) che, capaci di attivare direttamente la cascata delle caspasi, inducono l'apoptosi. Diversi studi dimostrano che il rilascio di queste proteine può essere impedito dalla proteina Bcl-2, localizzata a livello mitocondriale, che inoltre ha la possibilità di inibire la cascata delle caspasi legandosi alla proteina "Apoptosis activating factor 1" (Apaf-1) (Zhu et al., 2004).

### 1.3.1 Le principali pathways apoptotiche

Le cellule sono in grado di attivare l'apoptosi attraverso diversi meccanismi biochimici, regolati geneticamente, a partenza sia dal nucleo (pathway intrinseca) che dalla membrana plasmatica (pathway estrinseca).

Ambedue le pathways convergono in una unica via che porta all'attivazione di una serie di effettori centrali dell'apoptosi: il gruppo di proteasi cisteiniche chiamate caspasi (Fig. 10).

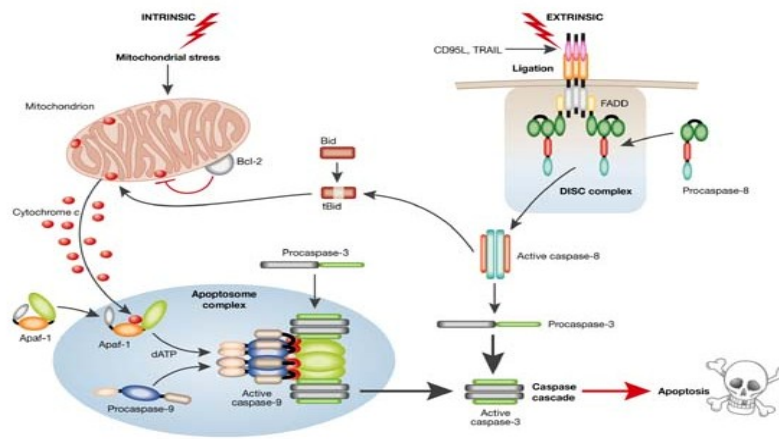


Fig. 10: Principali pathways apoptotiche.

#### 1.3.1.1 Via estrinseca

Viene indotta principalmente dall'attivazione dei recettori di membrana membri della superfamiglia del TNF (tumor necrosis factor), i death receptors. Tra questi i principali sono Fas/ Apo-1/CD95, TRAIL-R1/DR4 e TRAIL-R2/DR5, in grado di trasmettere diversi tipi di segnali, fra i quali quelli apoptotici, all'interno della cellula.

I Death receptors (DRs) trasmettono il segnale apoptotico in seguito al legame con specifici ligandi di morte determinando la morte della cellula per apoptosi in poche ore. Questi recettori sono conosciuti anche come recettori transmembrana di tipo 1, in quanto sono caratterizzati da un dominio extracellulare ricco di cisteine (CRD), e da un dominio intracellulare (DDs).

L'estremità intracellulare citoplasmatica contiene una regione DD (death domain) di circa 80aa la cui funzione è quella di attivare il programma di morte cellulare. Il DD consiste di sei  $\alpha$ -eliche anfipatiche antiparallele organizzate in una configurazione che determina l'esposizione sulla superficie di un elevato numero di residui carichi. A seguito del legame con il recettore specifico, i DD, di uno stesso recettore o di recettori diversi, si associano, presumibilmente attraverso interazioni di tipo elettrostatico e richiamano altre proteine (provviste anch'esse di DD) che funzionano da adattatori nel fenomeno di trasduzione del segnale. L'associazione di queste molecole porta ad attivazione, tramite autoclivaggio di particolari proteasi denominate caspasi. Tra queste principalmente la caspasi-8, la cui forma attiva cliva a sua volta vari substrati fra i quali altre caspasi con conseguente amplificazione a cascata del processo apoptotico (Gniadecki et al., 1997). In realtà, esistono due vie di segnalazione death receptors dipendenti che attivano lo stesso complesso DISC (death-inducing signalling complex). La prima via di segnalazione richiede l'attivazione della caspasi-8 e in seguito della caspasi-3. Nella seconda via, invece, l'attivazione della caspasi-8 è seguita dall'attivazione mitocondriale. In altre parole, la via estrinseca recluta l'attivazione della via intrinseca. In questo caso l'attivazione mitocondriale coinvolge il clivaggio, mediato dalla caspasi-8, della proteina Bid, appartenente alla famiglia delle proteine BH3 (Bcl-2 Homology 3). La forma troncata di Bid (tBid) è critica per il rilascio dei fattori proapoptotici mitocondriali, il citocromo c, Smac/Diablo e AIF.

### **1.3.1.2 Via intrinseca**

I mitocondri rappresentano i siti principali di iniziazione della via intrinseca, sebbene negli ultimi anni sia stato dimostrato un coinvolgimento anche del reticolo endoplasmatico (Fulda et al., 2006). I mitocondri giocano un ruolo predominante sia nel metabolismo cellulare sia nel processo apoptotico. Diverse proteine apoptotiche sono localizzate all'interno dei mitocondri, e, in seguito ad uno stimolo, queste vengono rilasciate dal mitocondrio localizzandosi in prossimità del loro sito d'azione.

#### **1.3.1.2.1 Le proteine della famiglia di Bcl-2**

Bcl-2 è una famiglia di proteine regolatrici del processo apoptotico suddivise in due gruppi: proteine pro-apoptotiche (Bax, Bak, Bcl-XS, Bad, Bid, Bik, HrK) e proteine anti-apoptotiche (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Bfl-1, ecc), il cui equilibrio all'interno della cellula è importante per determinare l'eventuale progressione verso l'apoptosi. Queste proteine presentano una elevata omologia di sequenza nonostante l'opposta funzione, e mostrano entrambe la capacità di formare canali in vitro sia come omodimeri che come eterodimeri, associandosi fra loro. Sia le proteine pro-apoptotiche che quelle anti-apoptotiche sono state caratterizzate e la loro classificazione è legata alla presenza o assenza del dominio BH (Bcl-2 Homology). Finora sono stati descritti 4 domini BH: BH1, BH2, BH3 e BH4. Bcl-2 ed i suoi omologhi sono localizzati fra le due membrane mitocondriali dove, presumibilmente, formano dei canali ionici selettivi che hanno la funzione di stabilizzare il potenziale transmembrana. Queste proteine regolano la permeabilità della membrana mitocondriale sia promuovendo che sopprimendo il rilascio di proteine da parte di questi organuli. In particolare la famiglia di Bcl-2 regola la liberazione nel citosol del citocromo c (Zhu et al., 2004) innescando così una cascata di reazioni proteolitiche tra cui una serie di

caspasi “esecutive” che portano alla morte cellulare (Xia et al., 2004). Sono state identificate due sottofamiglie di proteine pro-apoptotiche: la famiglia di Bax (Bax, Bok e Bak), contenente i domini BH1, BH2 e BH3; e la famiglia di proteine contenente solo BH3 (Bid, Bim, Bik, Bad, Bmf, Hrk, Noxa, e PUMA). L'esatto meccanismo di funzionamento di queste famiglie di proteine non è stato ancora del tutto chiarito, sembra comunque che siano essenziali per il completamento del programma apoptotico (Ashe et al., 2003).

#### **1.3.1.2.2 La proteina Bax**

Bax è un membro pro-apoptotico della famiglia delle proteine Bcl-2. Si tratta di una proteina codificata da sei esoni, ognuno dei quali può andare incontro a splicing alternativo generando così varie isoforme. La sequenza aminoacidica di Bax contiene un corto “suicide domain” che è indispensabile per la sua azione. L'inserzione di questo dominio al posto della corrispondente, ma divergente, sequenza in Bcl-2, converte questa proteina da inibitore ad attivatore dell'apoptosi. Questo significa che la funzione di Bax è conferita da una specifica regione e spiega anche l'antagonismo reciproco fra Bcl-2 e Bax. La massiccia espressione di Bax e la sua traslocazione a livello della membrana mitocondriale conseguenti all'azione di p53, permettono sia la formazione di canali nella membrana mitocondriale, sia l'interazione con i canali anionici mitocondriali attivati da voltaggio (VDAC). Questo causa la perdita del potenziale elettro-chimico di membrana e il rilascio del citocromo c. Entrambi questi eventi precedono l'attivazione della cascata enzimatica delle caspasi, che culmina con l'apoptosi della cellula.

### **1.3.1.2.3 Il rilascio del citocromo C**

Il citocromo c è normalmente localizzato nello spazio intermembrana del mitocondrio ed è rilasciato nel citosol dove interagisce con la proteasi apoptotica (Apaf-1), ATP/dATP, e la caspasi-9 formando un complesso che prende il nome di apoptosoma. Apaf-1 contiene un dominio di morte detto CARD, che media le interazioni con la caspasi-9 e un dominio ripetuto WD-40 che pare abbia la funzione di mantenere la proteina inattiva in assenza di citocromo c. In presenza del citocromo c e di ATP/dATP, Apaf-1 subisce un cambiamento conformazionale che permette l'aggregazione e la formazione dell'apoptosoma. L'esposizione del sito CARD favorisce il reclutamento della pro-caspasi-9 e la conseguente attivazione trans-proteolitica. La caspasi-9 attiva direttamente le caspasi-3 e -7, che sono responsabili della morte della cellula.

### **1.3.1.3 Il ruolo delle caspasi nel programma apoptotico**

Le caspasi sono delle cisteino-proteasi che clivano i loro substrati in corrispondenza dei residui di acido aspartico (Asp-x-aa). Questi enzimi sono suddivisi in tre sottofamiglie in base alla specificità del substrato. La famiglia delle ICE-cisteino-proteasi (caspasi-1, -4 e -5) comprende quelle caspasi che sono coinvolte nei processi maturativi di numerose citochine e giocano un ruolo di primaria importanza nel processo infiammatorio. Le caspasi della sottofamiglia CED-3 (caspasi-2, -3 e -7) sono prevalentemente, se non esclusivamente, coinvolte nel processo apoptotico attivandone gli effettori specifici. Al terzo gruppo appartengono le caspasi-6, -8 e -9 che svolgono la loro azione attivando altre caspasi o clivando direttamente substrati apoptotici (Gniadecki et al., 1997). In particolare si osserva il clivaggio di proteine coinvolte nel DNA repair come la poly(ADP-ribose)-polimerase (PARP), proteolisi della laminina, indispensabile per l'organizzazione dell'architettura nucleare, e

frammentazione del DNA. PARP è un enzima che viene attivato principalmente nella risposta a fenomeni di stress. Si tratta di una proteina nucleare di 116kDa attivata in presenza di DNA frammentato, che regola il metabolismo del Poly(ADP-ribose) e catalizza la sintesi di polimeri di ADP-ribosio su proteine nucleari. Durante l'apoptosi, PARP viene diviso da una caspasi cisteino-proteasi a livello dei residui di acido aspartico generando due frammenti inattivi: uno di 31kDa che contiene la regione N-terminale del dominio di legame al DNA ed uno di 85kDa che contiene il dominio di automodificazione ed il dominio di legame per il NAD (Scovassi et al., 2004; Mader et al., 1998).

Per quanto riguarda la loro struttura le caspasi esistono come zimogeni contenenti un predominio ed un dominio proteasico (Oryns et al., 1998; Thornberry et al., 1998). Le caspasi aventi lunghi predomini sono ritenute essere le caspasi iniziatrici; tra queste, la caspasi-8 e la caspasi-10 contengono due ripetizioni consecutive dei "death effector domains" (DEDs) all'interno dei loro predomini. Interazioni omotipiche tra i DEDs delle caspasi-8 e -10 ed il DED di una molecola adattatrice, una proteina associata a Fas attraverso un DD, quale FADD, inducono il reclutamento di queste caspasi e la loro successiva attivazione. Un altro gruppo di caspasi aventi un lungo predominio include la caspasi-1, la caspasi-2, la caspasi-4 e la caspasi-9, ognuna delle quali contiene un "dominio di reclutamento" (CARD). I CARD di tali caspasi interagiscono con molecole adattatrici contenenti gli stessi domini e dovrebbero andare incontro ad una simile aggregazione, mediata da un adattatore, e successiva auto-attivazione.

Al contrario, le caspasi aventi corti predomini, quali la caspasi-3, la caspasi-6 e la caspasi-7, sono considerate caspasi effettrici, la cui attivazione dipende dalle caspasi iniziatrici.

Il dominio proteasico contiene una grande subunità e una piccola subunità; l'attivazione delle caspasi si presume coinvolga due steps proteolitici

consecutivi dopo la formazione di un oligomero: per prima viene rilasciata la subunità più piccola del dominio proteasico al C-terminale, poi segue la separazione del predominio della grande subunità della proteasi. Studi cristallografici suggeriscono che le caspasi attive sono degli eterotetrameri composti da due subunità grandi e due subunità piccole (Wang et al., 2000).

La caspasi-8 e la caspasi-10 sono reclutate dal complesso recettore di morte/proteina adattatrice, ma non sono capaci di attivarsi a vicenda quando si trovano in prossimità l'una dell'altra indicando che entrambe probabilmente inducono l'apoptosi in modo indipendente riconoscendo proteine target differenti o dividendo le stesse proteine target ma con efficienza diversa. La caspasi-9 invece è la sola caspasi iniziatrice implicata nell'apoptosi mitocondrio-dipendente e l'interazione tra i CARDs della caspasi-9 e di Apaf-1 ne induce l'attivazione (Chen et al., 2002).

#### 1.4 Gli alimenti, i flavonoidi e la loro attività biochimica

Fin dall'antichità è nota l'esistenza di un legame tra ciò che assumiamo con la dieta e lo stato di salute o lo svilupparsi di alcune malattie. Nel 475 a.C. Anassagora sosteneva che **"nel cibo esistono dei principi che vengono assorbiti dal corpo umano e usati come componenti generativi"** (una prima intuizione dell'esistenza dei principi nutritivi); nel 400 a.C. Ippocrate diceva **"lascia che il cibo sia la tua medicina, e la medicina sia il tuo cibo"**. Nel 1747 il medico inglese James Lind condusse il primo esperimento di nutrizione, scoprendo che il succo di limone era in grado di far guarire dallo scorbuto. Solo negli anni 1930 si scoprì che questa proprietà era dovuta alla vitamina C (Bracewell et al., 1931). Da allora gli studi sulla importanza dei flavonoidi si sono moltiplicati ed oltre ad avere curato e risolto patologie mortali come lo scorbuto, è ormai assodato che si tratta di potentissimi agenti antiinfiammatori, antiallergici ed anti-infezione.

Recentemente inoltre lo studio dei flavonoidi ha risolto due paradossi interessanti:

- in Francia la dieta media francese, tipicamente ricca di grassi, non sembrava causare il livello di malattie che gli scienziati si aspettavano. Alla fine, i flavonoidi e l'acido ellagico, rintracciato nelle uve rosse e nere, sono emersi come veri e propri "baluardi nella difesa" della dieta francese, fornendo uno specifico beneficio protettivo (Cerdá et al., 2005; Talcott et al., 2002);
- lo stesso vale per le diete asiatiche, le quali sebbene ricche di cibi affumicati e conservati in salamoia, non presentano l'incidenza di patologie di cancro allo stomaco legate all'eccessivo utilizzo di tale tipo di alimenti proprio a causa dei benefici protettivi dei flavonoidi che si trovano nel tè verde, utilizzato in grosse quantità dagli asiatici (Chen et al., 2004).

Gli studi moderni sono oggi indirizzati nel capire come e perché i flavonoidi sono importanti per la nostra salute: sono dei potentissimi antiossidanti, e

poiché essi rappresentano la maggioranza dei polifenoli delle piante, sono stati candidati come dei potenti agenti protettivi della salute umana (Bisht et al., 2009). Allo stesso tempo è risultato evidente come la non corretta adesione alla dose giornaliera consigliata (RDA), provochi la comparsa di patologie degenerative nell'organismo umano, patologie che si possono manifestare in forma acuta o più spesso cronica (Petti et al., 2009).

### **1.5 L'uso dei fotoprotettori per la riduzione del danno cellulare**

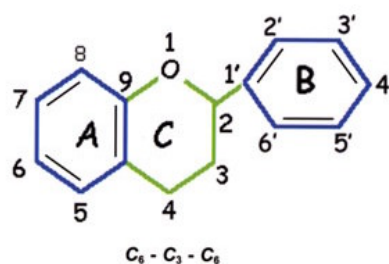
I flavonoidi sono composti chimici naturali, diffusi nelle piante superiori e particolarmente conosciuti ed apprezzati per le loro proprietà benefiche (Dinkova-Kostova et al., 2008). Sono dei composti polifenolici di solito presenti nelle piante come glicosidi o come agliconi. Si conoscono attualmente più di 4000 glicosidi dei flavonoidi e più di 1800 agliconi appartenenti a questa classe. Questa eterogenea classe di nutrienti è spesso indicata anche con il nome di **bioflavonoidi** e talvolta vengono raggruppati con la denominazione di **vitamina P**. L'ampia varietà di azioni biologiche ascritte ai flavonoidi dipende in gran parte dalla loro capacità di bloccare il danno provocato dai radicali liberi, che si correla in maniera importante con molte patologie croniche degenerative. I flavonoidi sono molto diffusi in natura, soprattutto nelle *angiosperme*, dove concorrono a determinare le sfumature gialle, rosse, azzurre ed arancioni di numerosi frutti (agrumi, mele, albicocche ecc.) ed ortaggi (cavoli, broccoli, spinaci, pomodori, finocchi, cipolle ecc.). Il loro nome deriva da *flavus* (biondo) e si riferisce al ruolo che giocano come pigmenti vegetali. La colorazione che donano ai tessuti dipende dal pH. I pigmenti blu si formano per chelazione con certi ioni metallici (ad esempio  $Fe^{3+}$  o  $Al^{3+}$ ). Un gruppo specifico di flavonoidi, le antocianine, è responsabile per i colori rosso, blu e violetto di fiori e frutta ed è quindi importantissimo come mediatore dell'impollinazione. Non stupisce

quindi il fatto che la varietà di sfumature di colore associata alle antocianine sia venuta aumentando attraverso il processo evolutivo.

Altrettanto importante notare come altri flavonoidi, flavoni e flavonoli, pur non essendo colorati per l'occhio umano, assorbono molto fortemente nello spettro UV e possono quindi essere visti dagli insetti. Molto spesso si ritrovano al centro dei fiori e servono come guida per l'atterraggio.

I flavonoidi si possono ritrovare anche nei semi, nelle cortecce, nei rizomi, nelle foglie e nelle radici di molte piante, nonché in alcune bevande (vino rosso, tè, succhi di frutta). Nel regno vegetale proteggono la pianta dagli effetti dannosi delle radiazioni solari, dalle aggressioni di patogeni ed intervengono attivamente nel suo metabolismo.

Chimicamente sono costituiti da uno scheletro composto da due fenili uniti da un eterociclo alifatico costituito da tre atomi di carbonio ed uno di ossigeno (Fig. 11). Le varie sottoclassi dei bioflavonoidi vengono classificate secondo lo schema di sostituzione dell'anello C. Sia lo stato di ossidazione dell'anello eterociclico che la posizione dell'anello B sono importanti per la classificazione.



**Fig. 11:** L'espressione *composti flavonoidi* indica generalmente l'intera classe dei fenoli vegetali, che hanno struttura C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, che significa due anelli aromatici legati da una catena di 3 atomi di carbonio (o anello).

Sulla base di quanto detto vengono distinti in: flavani, flavoni, flavonoli, gli isoflavonoidi, i calconi, i triterpeni/antrachinoni, gli acidi fenolici.

I **flavani** sono composti incolori che si trovano principalmente nella frutta e nel tè (verde e nero). Come biflavani sono comunemente presenti nella frutta, nel luppolo, nelle noci e nelle bevande prodotte da essi incluse il cacao ed il tè (Moawad et al., 2010). I flavani sono complessi nella loro struttura e denominazione. Possono essere presenti come monoflavani, biflavani e triflavani. Raramente si trovano nella forma glicosilata, tuttavia possono essere esterificati con l'acido gallico e di norma sono parte di un biflavano o triflavano.

I **flavoni** sono invece una sottoclasse di composti chimici la cui struttura chimica è basata su uno scheletro  $C_{15}$  di atomi di carbonio composto da due anelli aromatici ed un eterocidico. Rappresentano una classe numerosa di composti, presenti principalmente nella forma glicosidica. Hanno distribuzione molto ampia e sono comuni generalmente in famiglie erbacee come *Lamiaceae*, *Apiaceae* e *Asteraceae*. L'apigenina e la luteolina sono particolarmente comuni nelle foglie, ma si trovano anche in radici, corteccia e fiori (Kasaj et al., 2001). Sono composti di colore giallo tenue. Sono presenti nei cereali, nella frutta, nelle erbe e negli ortaggi. Tra questi la nobiletina, la sinensetina e la tangeretina (flavoni del citro) sono quelle che determinano il gusto aspro di alcuni frutti. La neodiosmina, un altro flavone del citro, riduce l'asprezza della limonina, della naringina, della caffeina, della chinina e della saccarina.

I **flavonoli** sono distribuiti ampiamente nel regno vegetale, generalmente in angiosperme lignificate. La quercetina e il quercitolo sono presenti in *Ruta graveolens*, *Fagopyrum esculentum*, *Sambucus nigra* e in moltissime altre piante; il kampferolo si trova in *Sambucus nigra*, *Cassia senna*, *Equisetum arvense*, *Lamium album*, *Polygonum bistorta* (Jung et al., 2010).

Gli isoflavonoidi sono incolori, si trovano quasi esclusivamente nei legumi, in modo particolare nei semi di soia (Wozniak et al., 2010). Nonostante siano presenti nei cereali commestibili, nelle radici e negli ortaggi verdi, le anticianine

si associano soprattutto ai frutti. Nelle mele, pere e nei frutti a nocciolo (albicocche, pesche, prugne) si trovano soprattutto nella pelle. In certi tipi di frutta come le bacche invece è probabile che siano presenti sia nella pelle che nella polpa. Nelle verdure le fonti principali delle anticianine sono varietà particolari (di solito verdi) dei fagioli, della verza e della cipolla, soprattutto del radicchio e del rabarbaro. Le anticianine si utilizzano anche come agenti coloranti per le bevande ed altri prodotti alimentari.

Le **catechine** sono composti incolori che si ossidano facilmente dando origine ad imbrunimenti e presentano anche forti proprietà astringenti (Unno et al., 2009).

I **calconi** sono pigmenti vegetali gialli dalla distribuzione limitata, presenti soprattutto nelle *Asteraceae* (Laciar et al., 2009). Spesso si trovano in natura insieme ai propri isomeri. Dal punto di vista biogenetico derivano da tre unità di acetato ed una di acido cinnamico.

Gli **antrachinoni** fanno parte invece della famiglia dei chinoni, pigmenti colorati presenti in molte piante anche se non contribuiscono molto alla colorazione nelle piante evolute; sono infatti presenti nelle cortecce, nei legni o nelle radici, oppure in tessuti, come le foglie, dove sono mascherati da altri pigmenti (Chiu et al., 2009). Sono basati su un nucleo comune, l'antracene e sono comunque piuttosto rari (l'emodina è la più comune). Si trovano prevalentemente nelle famiglie delle *Papilionaceae*, *Poligonaceae*, *Caesalpinaceae*, *Rhamnaceae* e *Liliaceae*.

Tra le *Papilionaceae* è particolarmente interessante la liquirizia. Si tratta di una pianta erbacea cespugliosa perenne le cui radici trovano ampio impiego in natura. Si tratta infatti di una importante fonte di magnesio che, nel nostro organismo è necessario per il metabolismo della vitamina C, del fosforo, del potassio e del sodio; inoltre il magnesio è importante per il sistema nervoso e per regolare la distribuzione del calcio nell'organismo. Le radici della liquirizia

contengono la glicirrizina, la sostanza più dolce che esiste in natura che, insieme ai glucosidi flavonoidi liquiritina ed isoliquiritina, conferisce alla liquirizia un'azione antinfiammatoria, antiossidante, antispastica e antivirale (Hayashi et al., 2000). Tra i principi attivi della liquirizia sono stati identificati: composti triterpenici e loro derivati, glucosidi flavonoidi, glucosio, vitamine. Il principio attivo più importante della pianta è sicuramente rappresentato dalla glicirrizina o acido glicirrizico, un glucoside della saponina conosciuto soprattutto per le sue proprietà antivirali, come promotore dell'attivazione dell'interferone e come inibitore della crescita di alcuni virus a DNA ed RNA. La glicirrizina per idrolisi libera acido D-glucoronico ed acido glicirretinico conosciuto anche con il nome di acido 18-β glicirretinico. Presenta proprietà espettoranti, antitussive ed anti-infiammatorie, in quanto inibisce l'enzima che metabolizza le prostaglandine. Dalla frazione idrofobica dell'estratto di liquirizia si ricava invece la glabridina, conosciuta per i suoi effetti benefici sulla pelle dovuti soprattutto alle proprietà anti-infiammatorie ed anti-ossidanti. Recentemente è stato dimostrato che la glabridina è in grado di inibire la melanogenesi grazie alla sua capacità di interferire con l'attività tirosinasi.

Gli **acidi fenolici** sono fenoli monometrici caratterizzati da un gruppo carbossile posto su un fenolo. Sono prevalentemente presenti nell'uva come acidi cinnamici (acido cumarico, acido caffeico, acido ferulico e acido clorogenico) i quali possono combinarsi con antociani ed acido tartarico, e gli acidi benzoici (acido p-idrossibenzoico, acido gallico, acido protocatechico, acido vanillico, acido salicilico ed acido siringico) che possono combinarsi con alcoli e tannini

## 1.6 Scopo della tesi

Negli ultimi anni numerose pubblicazioni sull'attività antiproliferativa ed antiossidante di alcune piante hanno confermato che tra i costituenti principali ci sono i flavonoidi, molecole in grado di interferire con le normali attività metaboliche di cellule di diversa origine.

Diversi lavori sperimentali hanno dimostrato una correlazione tra produzione di ROS e durata della vita (Victor et al., 2009). L'azione dannosa dei ROS è indirizzata soprattutto alle cellule, in particolare ai grassi che ne formano le membrane (per ossidazione lipidica), a zuccheri e fosfati, alle proteine (inducono inibizione enzimatica, denaturazione e degradazione delle proteine), alle LDL (lipoproteine a bassa densità) e al DNA (Fig. 12).

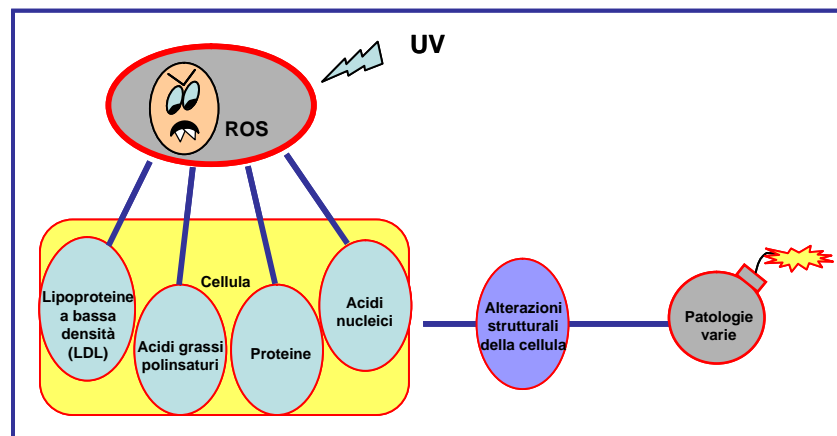


Fig. 12: Conseguenze sull'organismo dell'azione dei radicali liberi.

Interessanti risultati sono stati ottenuti trattando linee cellulari tumorali con concentrazioni crescenti di acidi fenolici (Zhang et al., 2008). In particolare, è stata osservata una buona correlazione tra la velocità di replicazione cellulare e la capacità di alcuni acidi fenolici, tra cui la cianidina-3-glucoside, il kaempferolo, la quercetina e l'acido ellagico, di ridurre significativamente il numero delle cellule tumorali mostrando anche una buona selettività d'azione nei confronti delle cellule controllo.

Altri lavori hanno invece dimostrato che l'isomero acido 18 $\beta$ -glicirretinico protegge dall'insorgenza di epatiti, mentre un pretrattamento con la glicirrizina protegge i topi Senecar dall'insorgenza di melanomi indotti dall'irradiazione con UV e o dal trattamento con il 2-aminofluorene (Agarwal et al., 2005).

Wu et al (2006). hanno recentemente dimostrato che le catechine prevengono il danno indotto ai cheratinociti dagli UVB attraverso un meccanismo che coinvolge l'inibizione della fosforilazione di JNK, mentre Srinivasan et al. (2007) ha dimostrato come l'acido ferulico agisce grazie alle sue notevoli proprietà antiossidanti.

Questi interessanti risultati e la necessità di individuare molecole in grado di offrire protezione dai danni indotti alle cellule dalle radiazioni ultraviolette hanno stimolato l'argomento di questo Dottorato di Ricerca, che ha avuto come scopo quello di individuare molecole naturali in grado di offrire protezione sia ai cheratinociti che ai melanociti umani normali dai danni indotti dalle radiazioni ultraviolette.

A questo scopo è stata approntata una ricerca su una serie di flavonoidi naturali.

Inizialmente lo studio è stato focalizzato sulla selezione di 45 molecole appartenenti a diverse classi della famiglia dei flavonoidi e sulla valutazione dell'effetto antiproliferativo ed antiossidante di queste molecole su colture di cheratinociti e melanociti umani normali esposti a radiazione ultravioletta. A questo scopo sono stati effettuati:

- uno screening tossicologico tramite test MTT per valutare la tossicità di tali sostanze sui cheratinociti e sui melanociti umani normali stabilendo un range di concentrazioni non tossiche;
- una valutazione dell'attività antiossidante mediante test del DCFH-DA per valutare il potere antiossidante di queste sostanze in seguito al trattamento con raggi UVB.

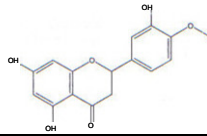
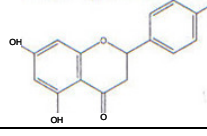
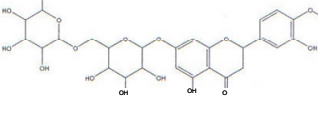
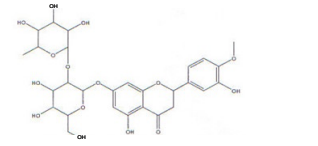
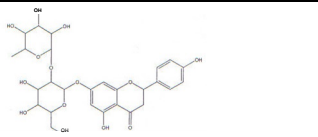
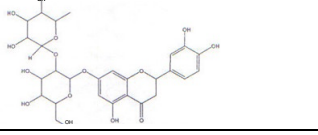
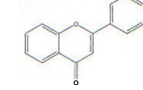
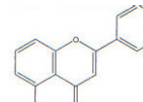
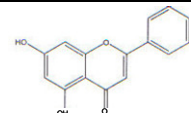
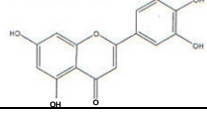
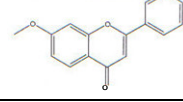
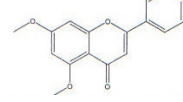
In seguito sono state selezionate solo il gruppo di molecole che avevano mostrato bassi livelli di tossicità ed un'attività antiossidante superiore all'80%. Poiché è noto che le radiazioni UVB inducono apoptosi nei cheratinociti e nei melanociti umani normali irradiati, lo studio è stato focalizzato sulla valutazione della eventuale attività anti-apoptotica, mediante analisi western-blot, di queste molecole dopo esposizione dei cheratinociti e dei melanociti alla dose di 50mJ/cm<sup>2</sup>. Infine si è cercato di comprendere quali fossero i meccanismi d'azione valutando gli effetti dei trattamenti sul ciclo cellulare e le pathway apoptotiche coinvolte.

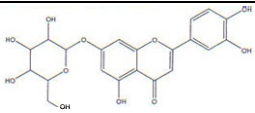
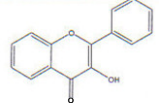
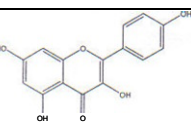
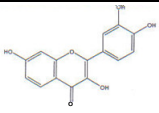
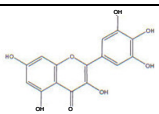
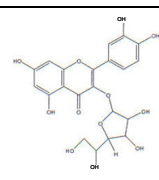
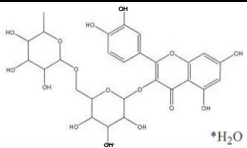
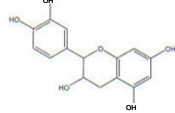
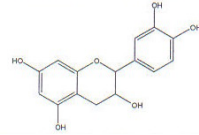
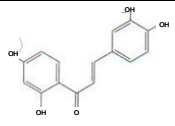
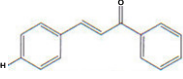
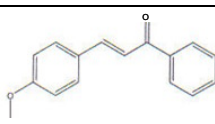
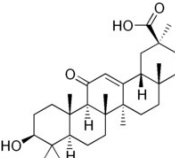
I risultati di questi test hanno dimostrato che solo 3 molecole, il kampferolo, l'acido 18β-glicirretinico e la glabridrina, erano in grado di diminuire l'apoptosi alla stessa maniera in entrambe le popolazioni cellulari trattate. Quindi nell'ultima fase dello studio si è cercato di comprendere quali fossero i meccanismi d'azione di queste tre molecole in particolar modo studiando gli effetti a livello del ciclo cellulare e le pathway apoptotiche coinvolte.

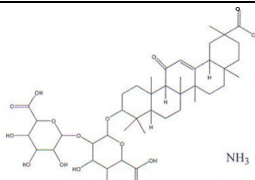
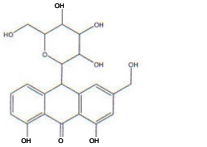
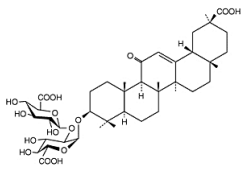
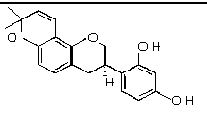
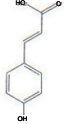
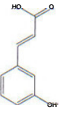
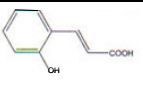
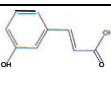
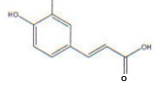
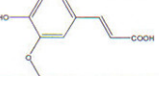
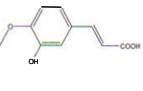
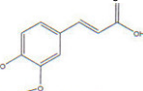
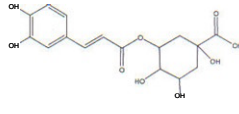
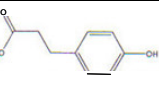
## **2. MATERIALI E METODI**

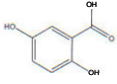
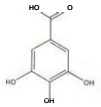
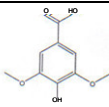
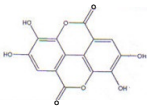
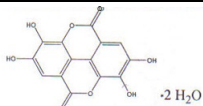
## 2.1 Sostanze testate

Nella presente ricerca sono stati utilizzati 45 flavonoidi naturali forniti dal Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università di Modena e Reggio Emilia (Tab1).

GRUPPO	Molecola	Struttura	Principali piante ed alimenti in cui sono presenti tali gruppi di molecole
FLAVANI	F1 Esperitina		Si trovano nella frutta, nel tè (verde e nero), nel luppolo, nelle noci e nelle bevande prodotte da essi incluse il cacao ed il tè. La proprietà astringente della birra, della frutta, dei succhi di frutta, del tè e del vino è dovuta principalmente al loro contenuto di biflavano. Si trovano nelle mele, nelle more, nei ribes neri, nell'uva, nelle pesche e nelle fragole. Nei cereali sono presenti nel sorgo e nei chicchi d'orzo.
	F2 Naringenina		
	F3 Esperidina		
	F4 Neoesperidina		
	F5 Naringina		
	F6 Neoericiotrina		
FLAVONI	F7 Flavone		Si trovano per lo più nelle erbe. Sono presenti nei cereali, nella frutta, nelle erbe e negli ortaggi. Sono i pigmenti gialli dei fiori. I composti più comuni sono l'apigenina e la luteolina. La nobiletina, la sinensetina e la tangeretina (flavoni del citro) hanno un gusto aspro. La neodiosmina, un altro flavone del citro, riduce l'asprezza della limonina, della naringina, della caffeina, della chinina e della saccarina. La tricina si trova nelle ali della farfalla.
	F8 5-idrossi flavone		
	F9 Crisina		
	F10 Luteolina		
	F11 7-Metossi flavone		
	F13 Dimetossi crisina		

	F14 Luteolina 7-o-glucoside		
FLAVONOLI	F15 3-idrossi flavone		Sono composti di origine vegetale appartenenti alla classe dei flavonoidi; sono distribuiti molto ampiamente nel regno vegetale, generalmente in angiosperme lignificate. La quercetina (aglicone del glicoside rutina) e il quercitolo sono presenti in <i>Ruta graveolens</i> , <i>Fagopyrum esculentum</i> , <i>Sambucus nigra</i> e moltissime altre piante; il kamferolo si trova in <i>Sambucus nigra</i> , <i>Cassia senna</i> , <i>Equisetum arvense</i> , <i>Lamium album</i> , <i>Polygonum bistorta</i> , ecc.
	F16 Kamferolo		
	F17 Fisetina		
	F18 Myricetina		
	F19 Isoquercitrina		
	F20 Rutina idrata		
CATECHINE	F21 (+)-Catechina		Contenute soprattutto nel tè ed in modo particolare in quello verde ( <i>Camelia sinensis</i> ) dove rappresentano circa il 20-30% del peso a secco contribuiscono a sostenere le funzioni cardiache e concorrono al mantenimento di un buono stato di salute. Ulteriori fonti di catechine sono rappresentate dal cacao, dal cioccolato e dal vino; sono inoltre ben rappresentate anche nel regno vegetale (frutta e verdura).
	F22 Epicatechina		
CALCONI	F23 Buteina		Sono pigmenti vegetali gialli, appartenenti alla classe dei flavonoidi, e dalla distribuzione limitata, presenti soprattutto nelle <i>Asteraceae</i> . Spesso si trovano in natura insieme ai propri isomeri (flavanoni). Sono rari appunto per la loro tendenza all'isomerizzazione. Dal punto di vista biogenetico derivano da tre unità di acetato ed una di acido cinnamico.
	F24 4-Idrossi calcone		
	F25 4-Metossi calcone		
TRITERPENI/ ANTRACHINONI	F26 Acido 18β-glicirretinico		Vengono prodotti da molte piante, soprattutto conifere e da alcuni insetti, sono i componenti principali delle resine e degli oli essenziali delle piante, miscele di sostanze che conferiscono a ogni fiore o pianta un caratteristico odore o aroma. Rappresentano anche i precursori biosintetici degli steroidi e del colesterolo. Molti aromi usati nei cibi o nei

	<b>F27 Acido glicirrizico-sale d'ammonio</b>		<p>profumi sono derivati da terpeni o terpenoidi naturali.</p> <p>Le piante ad antrachinoni sono probabilmente tra le più familiari al grande pubblico. Le più comuni sono <i>Cassia angustifolia</i> (<i>Senna</i>), <i>Rhamnus purshiana</i>, <i>Rhamnus frangula</i>, <i>Rheum palmatum</i>, <i>Rumex crispus</i> e <i>Aloe vera</i>.</p>
	<b>F28 Aloina</b>		
	<b>F29 Glicirrizina</b>		
	<b>F30 Glabridina</b>		
<b>ACIDI FENOLICI</b>	<b>F31 Acido-p-cumarico</b>		<p>Ne fanno parte aldeidi fenoliche o fenolate comuni in molti oli essenziali, quali salicilaldeide, 4-idrossibenaldeide, p-anisalaldeide, aldeide protocatecuica e la più diffusa vanillina. Quali acidi ne fanno parte invece l'acido salicilico, l'acido 4-idrossibenzoico, l'acido protocatecuico, l'acido vanillico, l'acido siringico, distribuiti nelle piante soprattutto come esteri O-glicosidici o come costituenti della frazione alcool-insolubile dei tessuti vegetali (ad esempio legati alla lignina). L'acido gallico è comune nelle specie legnose.</p>
	<b>F32 Acido-m-cumarico</b>		
	<b>F33 Acido 2-idrossi-cinnamico</b>		
	<b>F34 Acido 3-idrossi-cinnamico</b>		
	<b>F35 Acido caffeico</b>		
	<b>F36 Acido 4-idrossi-3-metossi cinnamico</b>		
	<b>F37 Acido 3-idrossi-4-metossi cinnamico</b>		
	<b>F38 Acido ferulico</b>		
	<b>F39 Acido clorogenico</b>		
	<b>F40 Acido floretico</b>		

F41 Acido gentisico	
F42 Acido gallico	
F43 Acido sirigico	
F44 Acido ellagico	
F45 Acido ellagico diidrato	

**Tab.1 .Elenco dei 45 flavonoidi utilizzati forniti dal Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università di Modena e Reggio Emilia.**

Per condurre i vari test sono state preparate soluzioni madre 30mM di ciascuna sostanza in esame, in modo tale da averle facilmente pronte attraverso diluizioni al momento dell'uso. Tutte le sostanze sono state diluite in dimetilsolfossido (DMSO) sterile.

## 2.2 Colture di cheratinociti e melanociti umani normali

I cheratinociti (CE) e i melanociti umani normali sono stati ottenuti da cute proveniente da interventi di chirurgia plastica. I lembi cutanei preparati con un dermatomo manuale in strato sottile, sono stati immersi over night a 37°C in una soluzione di dispase (neutral protease grade II, Boehringer-Mannheim), una proteasi neutra che separa la giunzione dermo-epidermica. I lembi epidermici così ottenuti sono stati immersi in una soluzione di tripsina (0,25%)/EDTA (0,02%) (Biochrom KG) in tampone fosfato (PBS) senza  $\text{Ca}^{++}$ - $\text{Mg}^{++}$  per 15 minuti a 37°C e poi dissociati tramite agitazione meccanica. Vengono quindi allestite colture primarie di CE e di melanociti. Per i CE è stata seguita la metodica originariamente descritta da Rheinwald e Green (Rheinwald et al.,

1975): i CE sono stati seminati in fiasche di coltura di  $75\text{cm}^2$  (Costar, USA), su un feeder layer di fibroblasti embrionali di topo ceppo Swiss J<sub>2</sub> (3T3), resi incapaci di dividersi tramite trattamento con mitomicina C (Sigma). Il terreno di coltura utilizzato è una miscela di Dulbecco's Modified Eagle's Medium 60% (DMEM) e F12 di Ham 30% (Seromed, Germania), addizionato con:  $5\mu\text{g/ml}$  insulina (Sigma),  $5\mu\text{g/ml}$  transferrina (Sigma, USA),  $2\text{nM}$  triiodotironina (Sigma),  $0,4\mu\text{g/ml}$  idrocortisone (Sigma),  $180\text{mM}$  adenina (Sigma),  $10\text{ng/ml}$  mouse epidermal growth factor (EGF) (Sigma) e 10% siero di vitello fetale (FCS). A questo punto i CE vengono passati in coltura secondaria dove viene utilizzato (Shipley et al., 1987) il Keratinocyte Growth Medium (KGM) (Clonetics, Svizzera) ottenuto da Keratinocyte Basal Medium (KBM) (Clonetics, Svizzera) addizionato con: 2ml estratto pituitario bovino (BPE),  $10\mu\text{g/ml}$  mouse epidermal growth factor (mEGF),  $5\text{mg/ml}$  insulina,  $0,5\text{mg/ml}$  idrocortisone (HC),  $0,5\text{ml}$  gentamicina-anfotericina B (GA-1000).

Per i melanociti, le cellule vengono invece seminate in fiasche di coltura da  $25\text{cm}^2$  (Costar, USA), ad una densità di  $100.000\text{ cellule/cm}^2$ . Il terreno utilizzato è il M254 (Clonetics, Svizzera) addizionato con: 0,2% estratto pituitario bovino (BPE), 0,5% foetal bovine serum,  $5\mu\text{g/ml}$  bovine insulin,  $5\mu\text{g/ml}$  bovine transferrin,  $3\text{ng/ml}$  basic fibroblast growth factor,  $0,18\mu\text{g/ml}$  idrocortisone,  $3\mu\text{g/ml}$  heparin,  $10\text{ng/ml}$  phorbol 12-myristate 13-acetate. Una volta confluenti i melanociti vengono passati in coltura secondaria ad una densità di  $15.000\text{ cell/cm}^2$ .

Se nel caso dei cheratinociti che dei melanociti umani normali sono stati utilizzati dei pool cellulari provenienti da soggetti diversi per età e sesso in modo da eliminare eventuali problemi di variabilità genetica. Gli stessi pool sono poi stati utilizzati nei diversi test.

### **2.3 Test Tossicologici: MTT Test (Methyl-Thiazole-Tetrazolium Test)**

Per effettuare uno screening tossicologico, sia i CE che i melanociti sono stati seminati in piastre multiwell da 96 pozzetti alla concentrazione di 8000 cellule/well. Una volta raggiunta la confluenza le cellule sono state trattate con le sostanze in esame valutando un range di concentrazione da 0 a 100µM. Dopo 24 ore è stato eseguito il test tossicologico MTT (Mossmann et al., 1983). Con questo test si riesce ad avere una indicazione sulla vitalità cellulare misurando la capacità ossidativa delle cellule in presenza di Sali di tetrazolio. È una determinazione degli enzimi coinvolti nella sintesi dell'ATP. I Sali di tetrazolio sono ridotti, da parte dell'enzima succinato deidrogenasi, in un composto insolubile in acqua, di colore rosso mattone, il formazano, che viene solubilizzato con dimetilsolfossido (DMSO). Solo le cellule vitali sono in grado di ridurre i Sali di tetrazolio. Dopo 24 ore dal trattamento, una soluzione di MTT allo 0,5% viene aggiunta in quantità di 20µl per ogni pozzetto, alla piastra multiwell. Le piastre vengono quindi poste nell'incubatore e dopo 4 ore è stato aspirato il mezzo e sono stati aggiunti ad ogni pozzetto 200µl di dimetilsolfossido. Ottenuta una soluzione omogenea, è stata effettuata la lettura allo spettrofotometro (Bio-Rad 550, USA) a 540nm.

### **2.4 Test per la valutazione della formazione intracellulare di specie reattive dell'ossigeno (ROS)**

Il DCFH-DA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate) assay si basa sull'impiego di una sonda fluorescente il H<sub>2</sub>DCF-DA. La DCFDA è una molecola lipofila, che attraversa la membrana cellulare per diffusione passiva; il suo gruppo acetato viene rimosso dalle diesterasi cellulari producendo una molecola carica negativamente non fluorescente e polare, il DCFH. Questo viene poi rapidamente ossidato dai ROS o da altri perossidi in un composto

altamente fluorescente il DCF che produce un segnale d'intensità proporzionale alla concentrazione dei ROS prodotti.

Tramite questo test è stato effettuato un ulteriore screening delle sostanze in esame sulla base dell'attività antiossidante dopo trattamento con raggi UVB. Per irradiare le cellule è stata utilizzata una lampada ad UVB (TL20W/12RS UVB Philips Medical Brakel, Olanda). Dopo 12 ore dal trattamento con le molecole in esame, le colture di CE e melanociti vengono lavate con PBS e poste a contatto con la soluzione contenente l' $H_2DCF-DA$ . Dopo 30 minuti di incubazione al buio si effettuano ulteriori lavaggi con PBS e quindi si irradia con gli UVB alla dose di  $50mJ/cm^2$  le cellule vengono irradiate in PBS con  $Ca^{++}$ - $Mg^{++}$ , contenente le sostanze in esame alla stessa concentrazione del pretrattamento.

Subito dopo si procede con la lettura allo spettrofluorimetro (eccitazione a 485 nm, emissione a 535 nm) (Savini et al., 1998).

## **2.5 Analisi del ciclo cellulare mediante citofluorimetria a flusso (FACS)**

Il ciclo cellulare è stato studiato mediante analisi FACS monoparametrica per mezzo di citofluorimetro. Dopo il trattamento le cellule vengono tripsinizzate con una soluzione contenente 0,05% tripsina- 0,02% EDTA. Le cellule vengono centrifugate a 1.200rpm per 8 minuti e 75.000 cellule per ogni campione vengono risospese in soluzione Nicoletti (50 $\mu$ g propidio ioduro, 0,1% sodio citrato, 0,1% Triton X-100). I campioni vengono quindi incubati per 15 minuti a 4°C al buio e letti mediante citofluorimetro Epics XL flow cytometer (Coulter Electronics Inc, Hialeah, USA).

## 2.6 Western-blot

Il western-blot è una tecnica che prevede la separazione delle proteine e il trasferimento su una membrana di nitrocellulosa (BLOTTING, Bio-rad, USA) per permettere l'ibridizzazione con un anticorpo e una caratterizzazione della corsa elettroforetica attraverso processi immunologici.

Per ottenere le proteine da sottoporre ad analisi con Western-blot e per determinarne le quantità da caricarne, è necessario procedere prima con la lisi cellulare e poi con un test di conta proteica.

Questo test è stato eseguito secondo il metodo tradizionale di Bradford (1976): le cellule, seminate in capsule Petri (90mm), sono state staccate dal fondo della piastra con l'aiuto di uno "scraper" e con tampone di lisi Ripa (50mM Tris-HCL 65mM pH6,8, 150mM NaCl, 1% Na deossicolato, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.2% NaN<sub>3</sub>), a cui sono stati aggiunti gli inibitori delle proteasi (Roche, USA) 0.01mg/ml. Il lisato è stato poi centrifugato per 15 minuti a 13.000rpm a 4°C. Dopo la centrifuga è stato raccolto il surnatante, contenente le proteine. Successivamente, a 20µl del lisato è stato aggiunto 1ml di una soluzione colorata (Protein Assay, Bio-Rad, USA) che reagisce con i residui tirosinici presenti nel lisato proteico. Infine si è proceduto con la lettura spettrofotometrica a 595nm (Spettrofotometro UV-1601, Shimadzu) ed al confronto colorimetrico dei valori ottenuti dai campioni con i valori ottenuti dalla curva di taratura di una proteina standard (Protein Assay, Standard 2, Bovin Serum Albumine, Bio-Rad, USA). Prima del caricamento su gel di SDS-poliacrilammide al 12%, ciascun campione è stato diluito in un tampone contenente glicerolo blu di bromofenolo e RIPA. Le proteine sono state separate mediante l'applicazione, per 2 ore, di una differenza di potenziale (d.d.p.) di 100 volts in presenza di un opportuno tampone (TRIS 1.5M, SDS 10%, H<sub>2</sub>O, pH 8.8). Terminata la separazione elettroforetica, è stato eseguito il trasferimento delle proteine ad una membrana di nitrocellulosa in una camera

riempita con un tampone (TRIS 25mM, glicina 192mM, metanolo 20%, H<sub>2</sub>O). La d.d.p. applicata è stata di 100 volts per 1 ora e 30 minuti. Avvenuto il trasferimento, la membrana di nitrocellulosa è stata colorata con Rosso Ponceau e lavata con acqua distillata. Le membrane di nitrocellulosa vengono quindi sottoposte a lavaggio in PBS/Tween 20, per rimuovere il tampone utilizzato e in seguito bloccate per 2 ore, in una soluzione al 5% di latte scremato (Blotting Grade Blocker non-fat Dry Milk, Bio-Rad) in delicata agitazione. Le membrane vengono quindi poste per tutta la notte, a 4°C, in una soluzione contenente gli anticorpi monoclonali anti-Bcl-2 (Dako, Denmark) diluito 1:40, anti p-53 (Santa Cruz, USA) diluito 1:500, anti bid diluito 1:300 (BD, USA), anti-PARP diluito 1:5000 (Biomol, USA), anti caspasi-8 diluito 1:500 (Calbiochem, MA), anti caspasi-9 diluito 1:1000 (Cell Signaling Technology, MA), p21 diluito 1:200 (Santa Cruz, USA), in una soluzione di latte all'1%. L'anticorpo anti  $\beta$ -actina (Sigma, USA) è stato utilizzato per il controllo dei carichi. Dopo incubazione overnight, sono stati effettuati ulteriori lavaggi in PBS/Tween 20 e le membrane sono state incubate con gli anticorpi secondari anti-mouse (IgG di topo, Bio-Rad, USA) o antirabbit coniugati con la perossidasi, diluiti 1:3000 in una soluzione all'1% di latte. La membrana di nitrocellulosa viene quindi incubata con una soluzione chemiluminescente (ECL, Amersham, UK) per 1 minuto, a temperatura ambiente e poi messa a contatto con una lastra di sviluppo (Hyperfilm-ECL, Amersham, UK).

### **3. RISULTATI**

Il presente lavoro ha preso in considerazione 45 molecole di origine naturale appartenenti al gruppo dei flavonoidi con lo scopo di individuare nuove molecole utilizzabili per la protezione cellulare da radiazioni ultraviolette. I test sono stati effettuati su cheratinociti e melanociti umani normali estratti da cute sana di pazienti sottoposti ad interventi di chirurgia plastica. Il primo obiettivo della seguente ricerca è stato quello di selezionare tra tutte le molecole in esame quelle con l'attività antiproliferativa ed antiossidante migliore.

### **3.1 Valutazione della tossicità dei flavonoidi su colture di cheratinociti e melanociti umani normali mediante test MTT**

Per valutare l'efficacia dei composti *in vitro* si è reso necessario prima di tutto effettuare un test di screening valutando la tossicità in un range di concentrazioni tra 0 e 100µM. A questo scopo è stato utilizzato il test con i Sali di Tetrazolio (MTT). Attraverso questo test abbiamo potuto selezionare le molecole dotate di una minore tossicità dopo trattamento per 24 ore. Come mostrato in Fig. 13 nel caso dei CE dopo test con MTT apparivano meno tossiche l'esperitina, la naringenina e la naringina per i flavani (Fig. 13a); il flavone, il 5-idrossi flavone, la luteolina e la dimetossi crisina per i flavoni (Fig. 13b); il kampferolo e la rutina idrata per i flavonoli (Fig. 13c); la +(-)catechina e l'epicatechina per le catechine (Fig. 13d); la buteina per i calconi (Fig. 13e); l'acido 18β-glicirretinico, l'acido glicirrizico-sale d'ammonio, l'aloina, la glicirrizina e la glabridrina per triterpeni ed antrachinoni (Fig. 13f-i); tutti gli acidi fenolici (Fig. 13l-m).

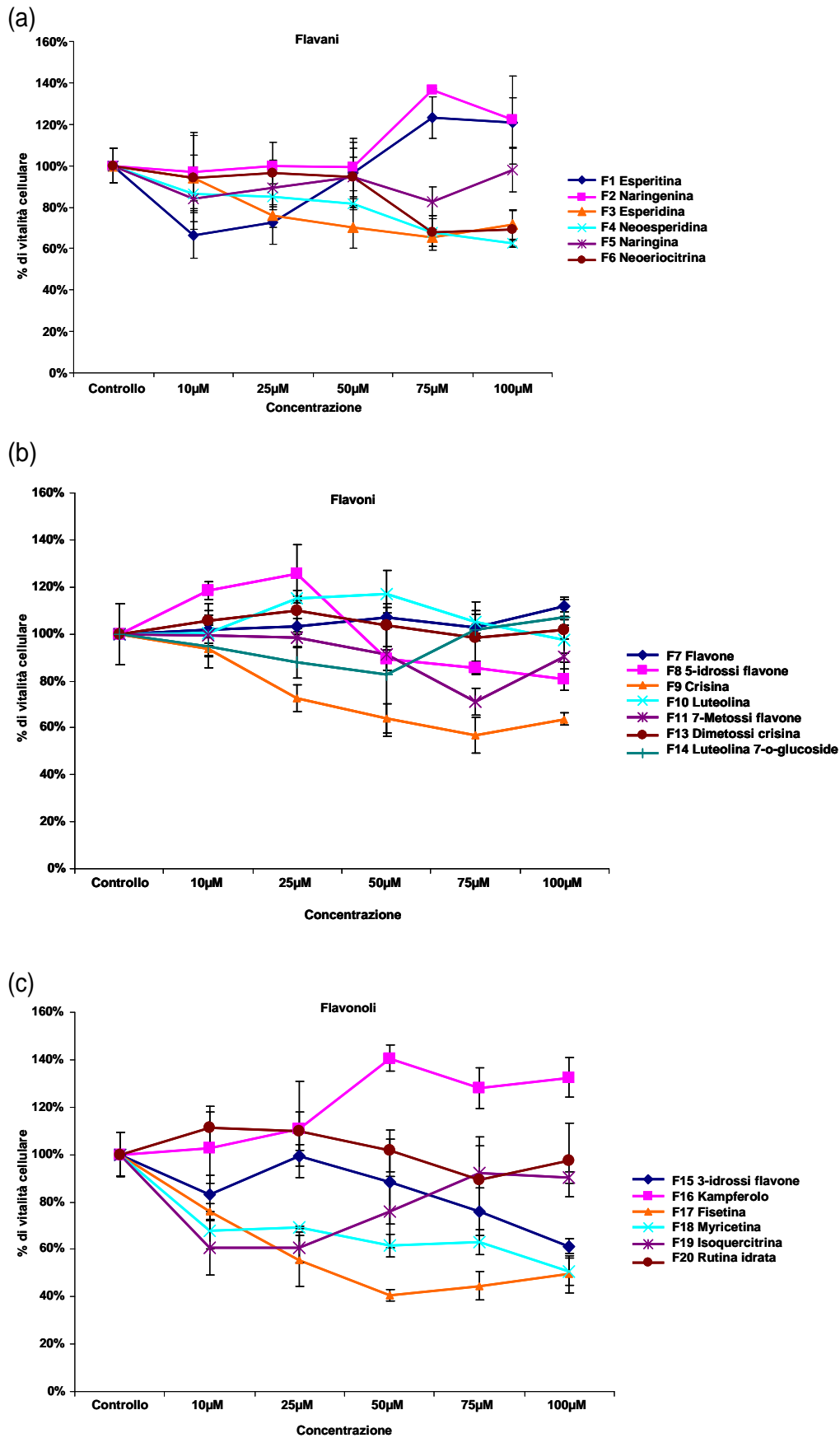


Fig. 13: Risultati del test MTT sui cheratinociti umani normali: (a) Flavani, (b) Flavoni, (c) Flavonoli.

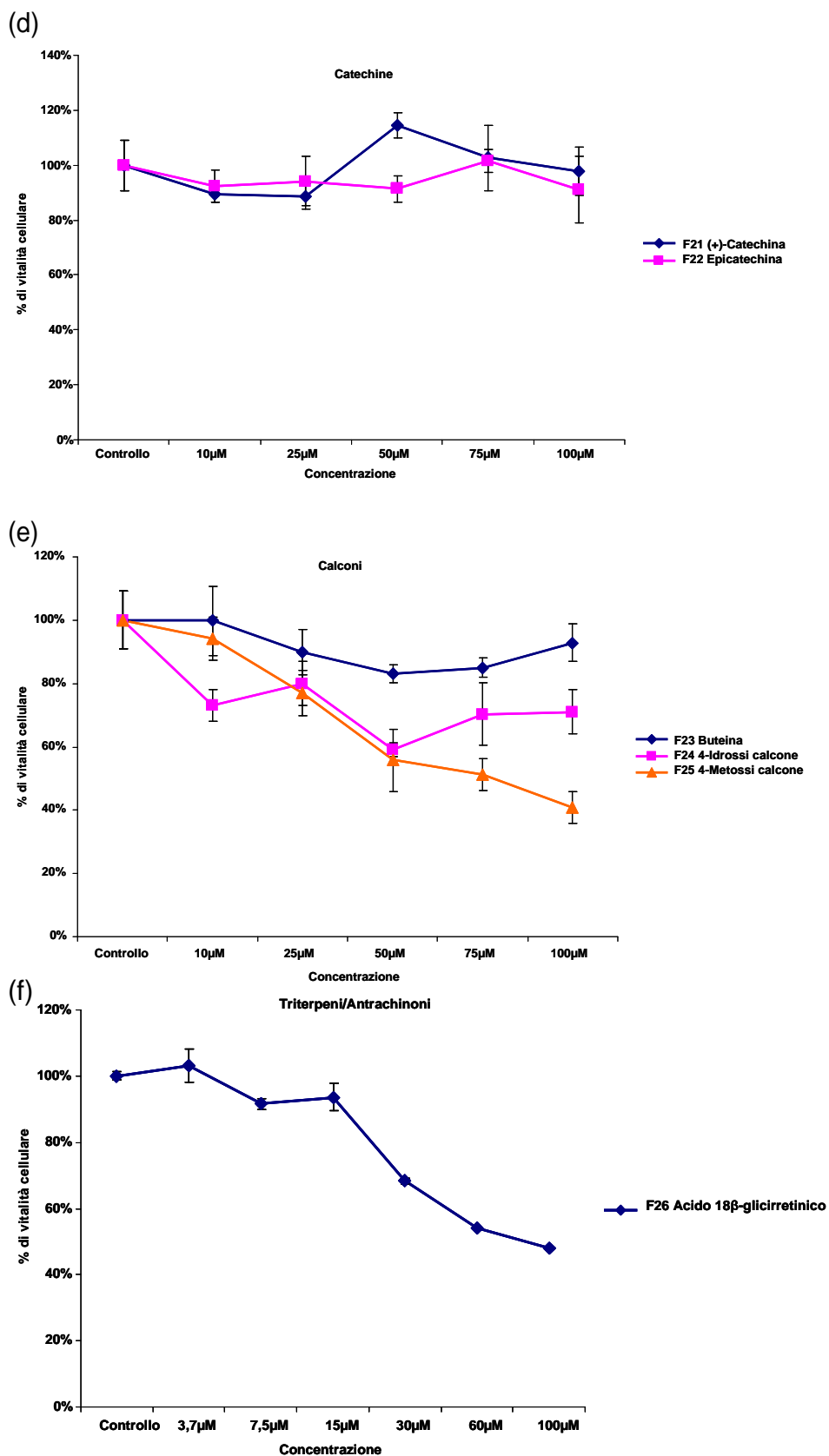


Fig. 13: Risultati del test MTT sui cheratinociti umani normali: (d) Catechine, (e) Calconi, (f) Triterpeni/Antrachinoni.

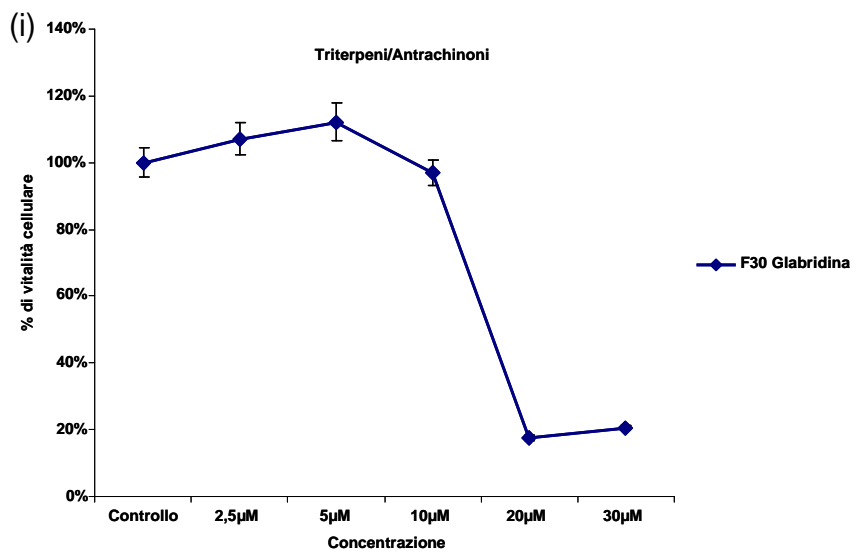
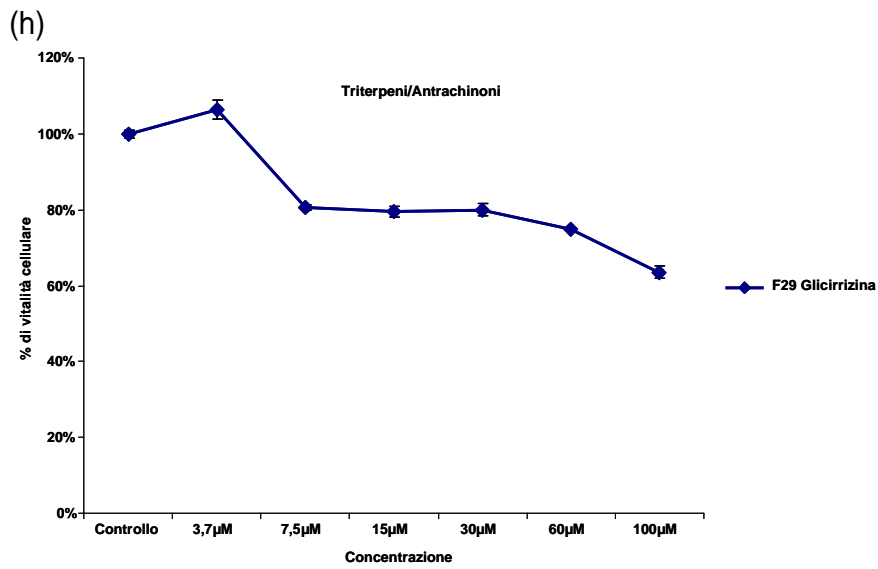
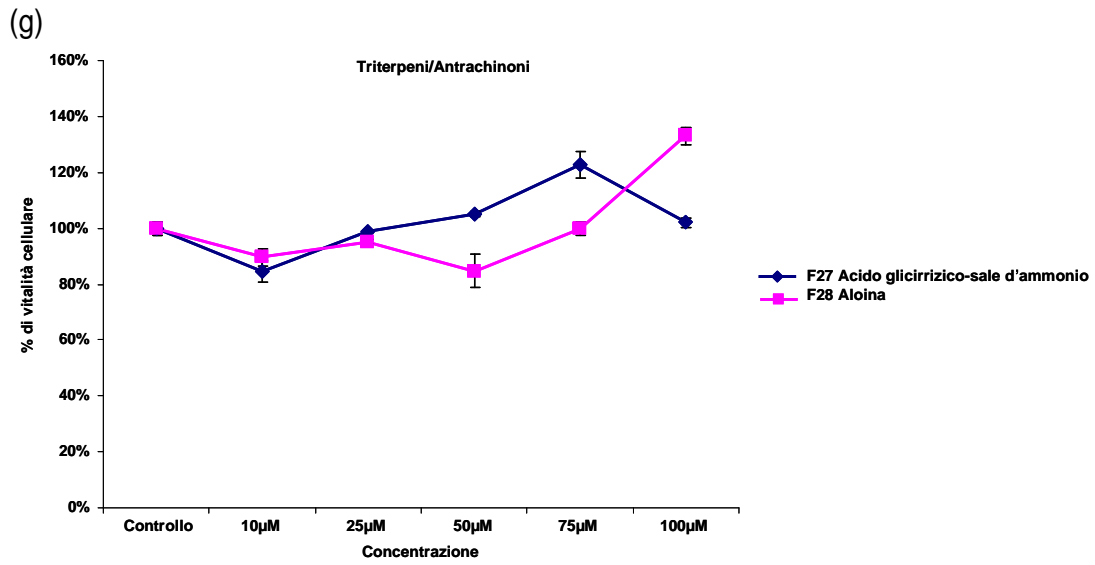
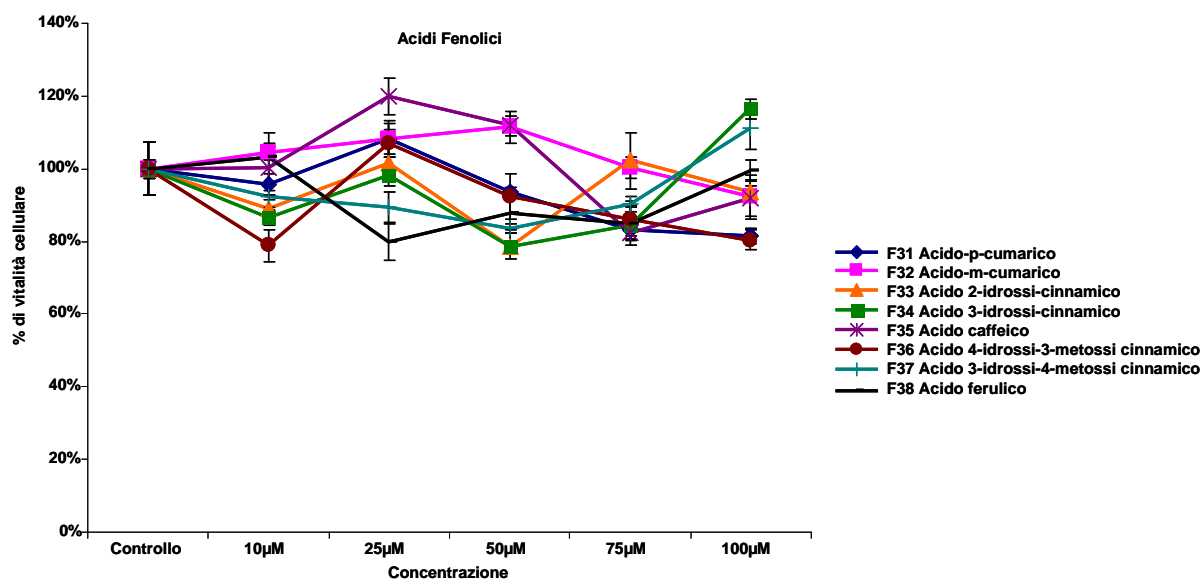


Fig. 13: Risultati del test MTT sui cheratinociti umani normali: (g) (h) (i) Triterpeni/Antrachinoni.

(l)



(m)

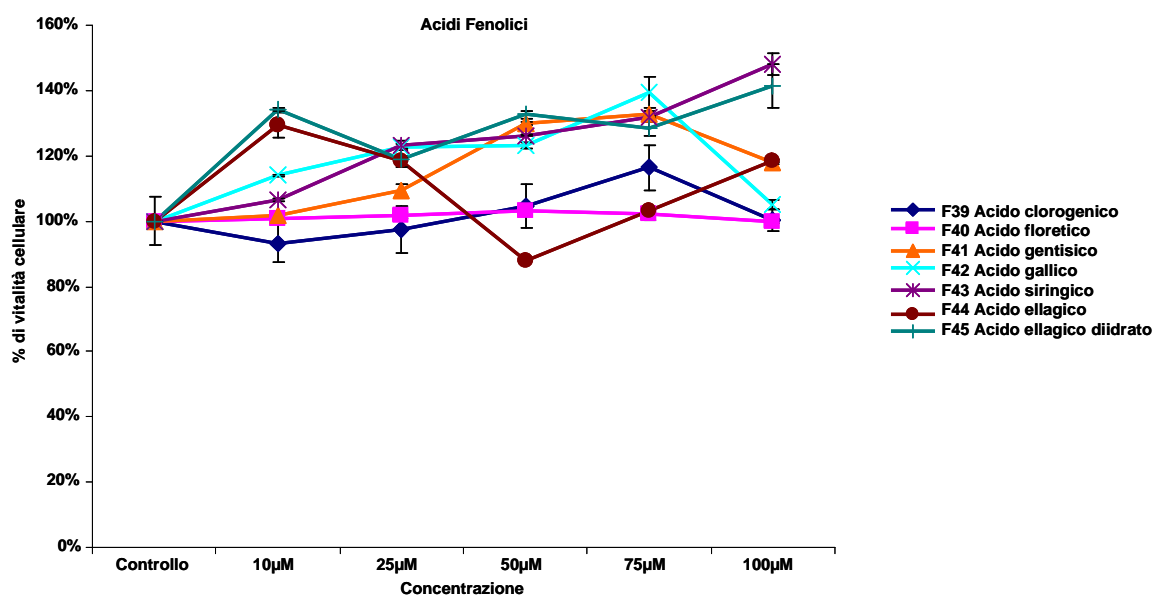


Fig. 13: Risultati del test MTT sui cheratinociti umani normali: (l) (m) Acidi fenolici.

Nel caso dei melanociti umani normali invece le sostanze che hanno mostrato una tossicità inferiore sono state: tutti i flavani (Fig. 14a); il flavone, il 5-idrossi flavone, la crisina, la luteolina, il 7-metossi flavone per i flavoni (Fig. 14b); il kampferolo, l'isoquercitrina e la rutina idrata per i flavonoli (Fig. 14c); la +(-) catechina e l'epicatechina per le catechine (Fig. 14d); la buteina per i calconi (Fig. 14e); l'acido 18 $\beta$ -glicirretinico, l'acido glicirrizico-sale d'ammonio, l'aloina,

la glicirrizina e la glabridina per triterpeni ed antrachinoni (Fig. 14f-g); l'acido 3-idrossi cinnamico, l'acido 4-idrossi 3-metossi cinnamico, l'acido ferulico, l'acido clorogenico, l'acido floretico, l'acido gentisico e l'acido siringico per gli acidi fenolici (Fig. 14 h-i). Grazie ai risultati evidenziati da questo test è stato possibile scegliere la concentrazione d'uso migliore per i successivi esperimenti, che sia nel caso dei CE che dei melanociti è di 30 $\mu$ M per l'acido 18 $\beta$ -glicirretinico e la glicirrizina, 10 $\mu$ M per la glabridina e 75  $\mu$ M per tutte le altre.

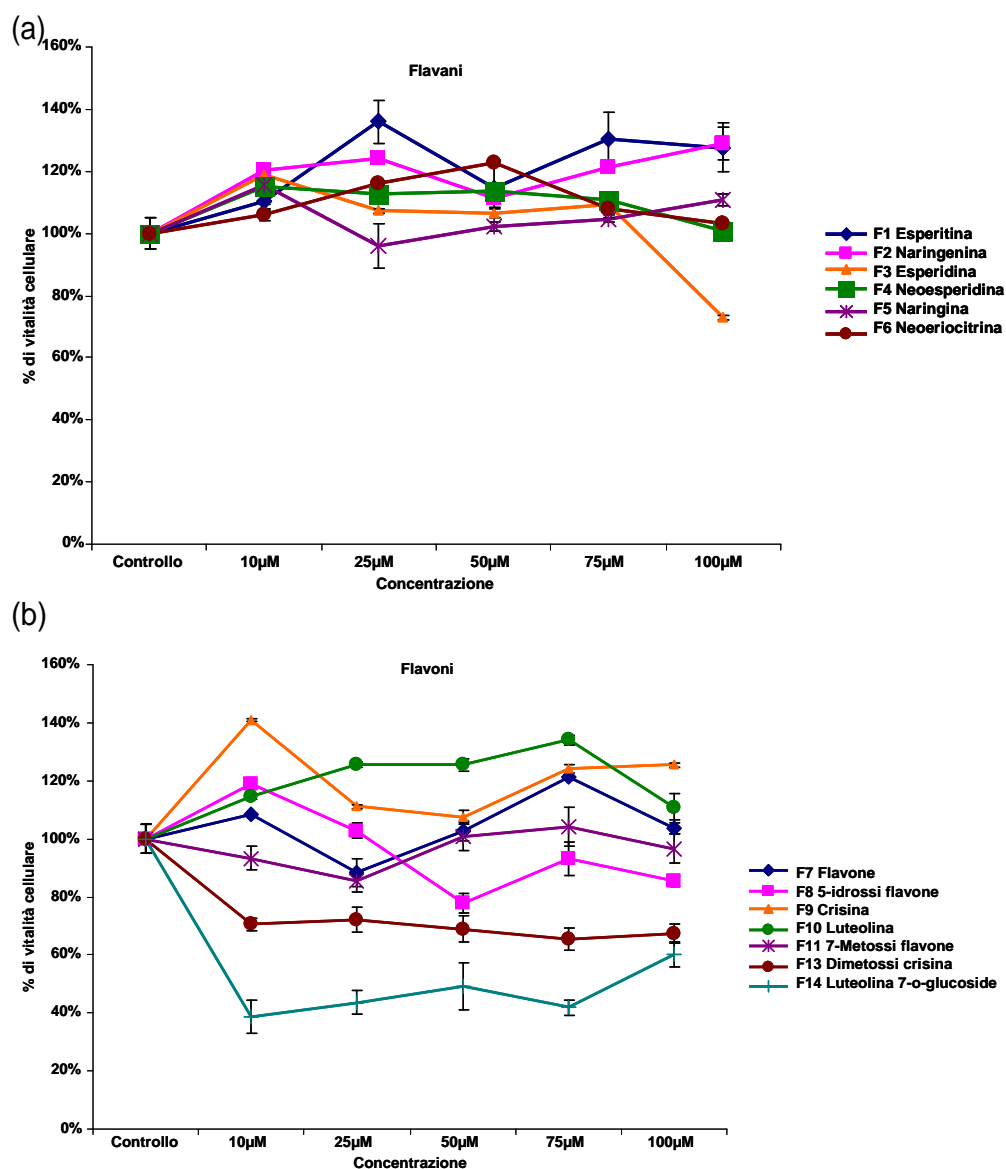


Fig. 14: Risultati del test MTT sui melanociti umani normali: (a) Flavani, (b) Flavoni.

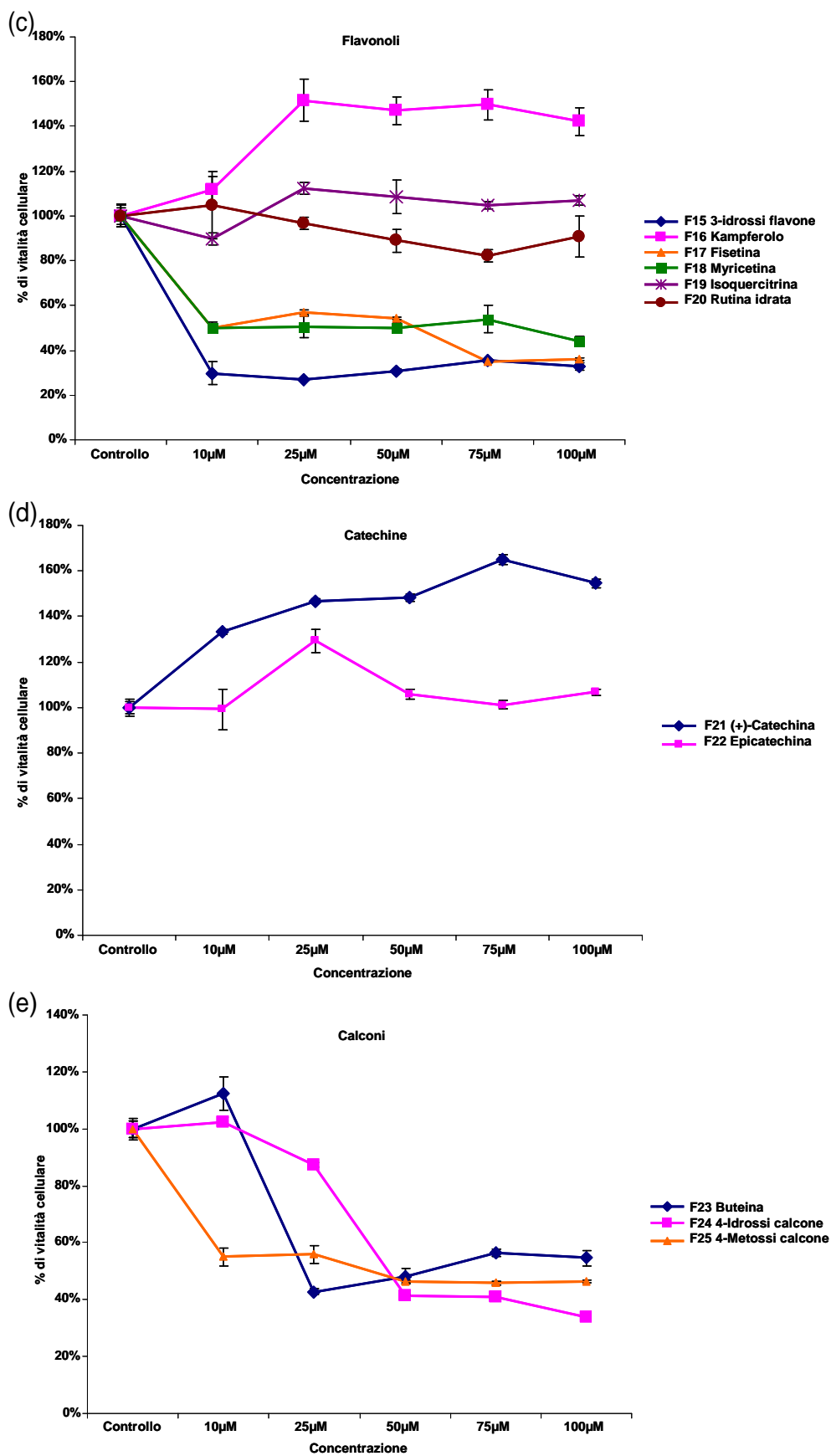


Fig. 14: Risultati del test MTT sui melanociti umani normali: (c) Flavonoli, (d) Catechine, (e) Calconi.

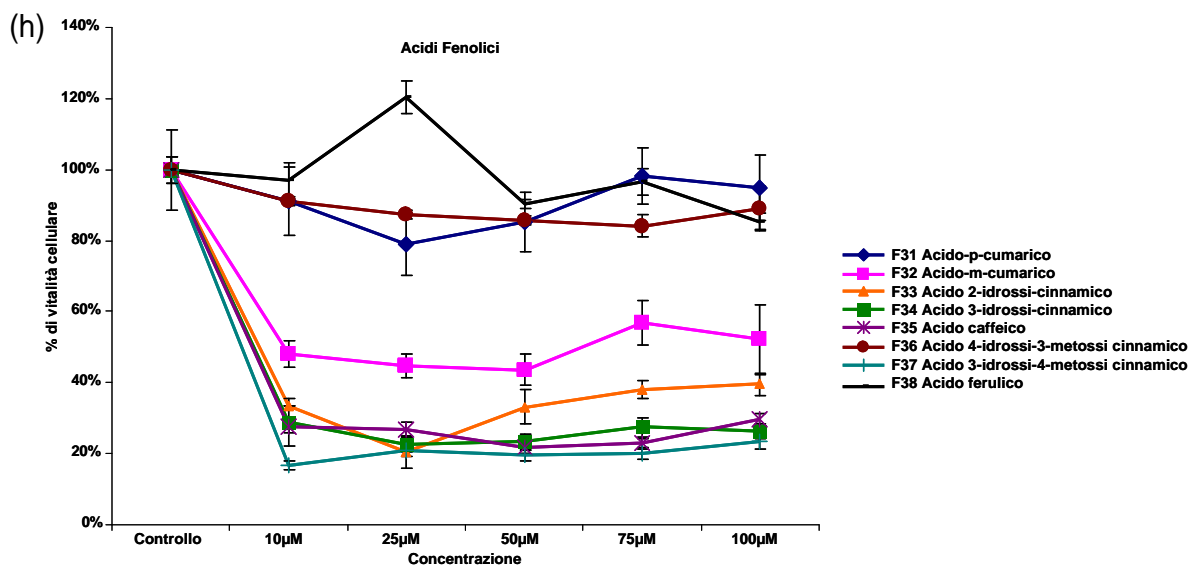
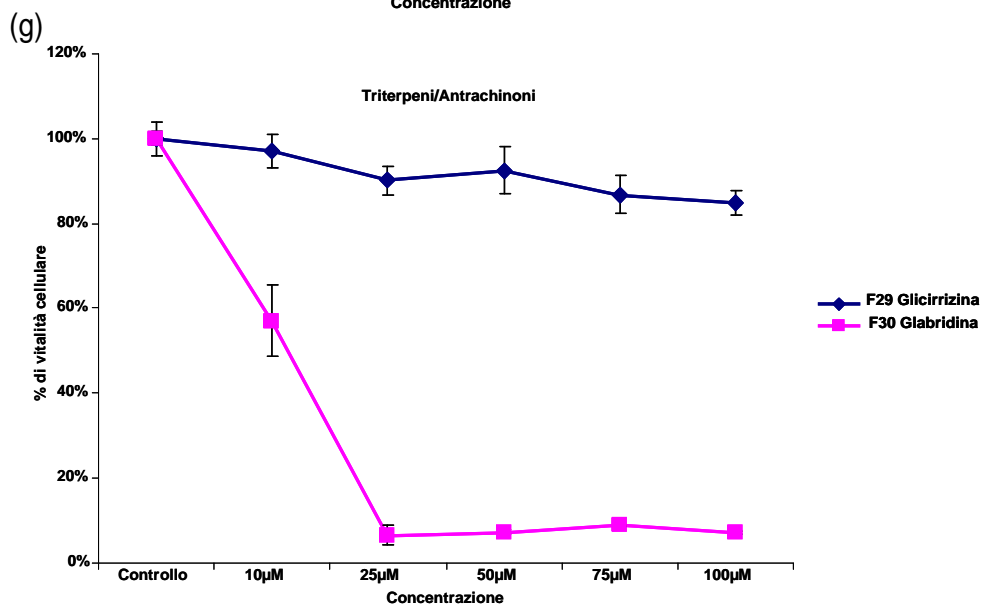
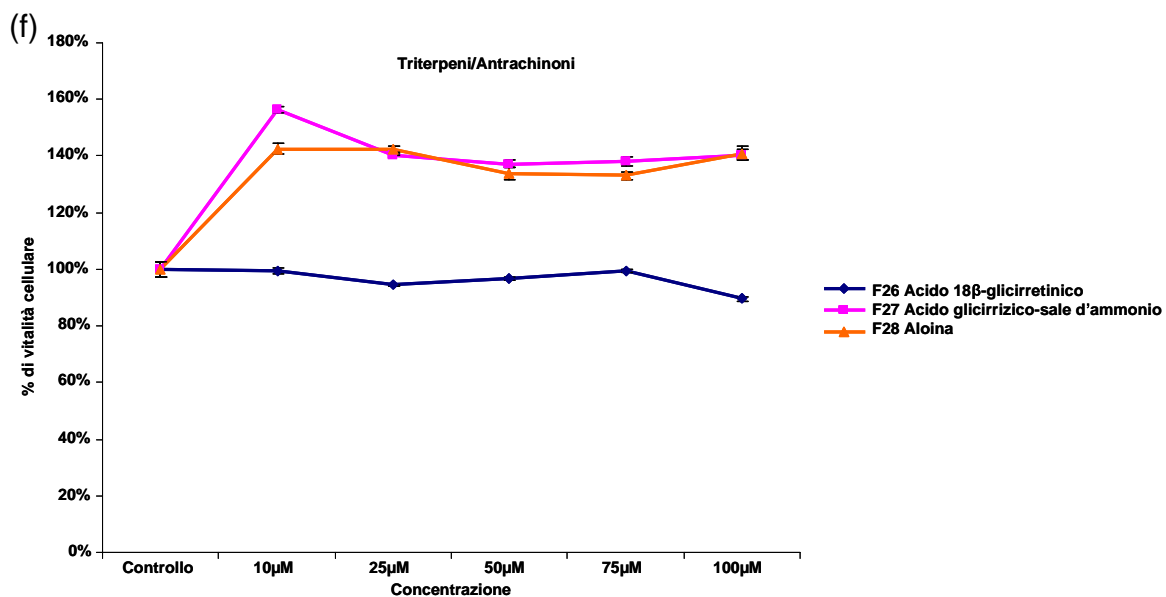


Fig. 14: Risultati del test MTT sui melanociti umani normali: (f) (g) Triterpeni/Antrachinoni, (h) Acidi Fenolici.

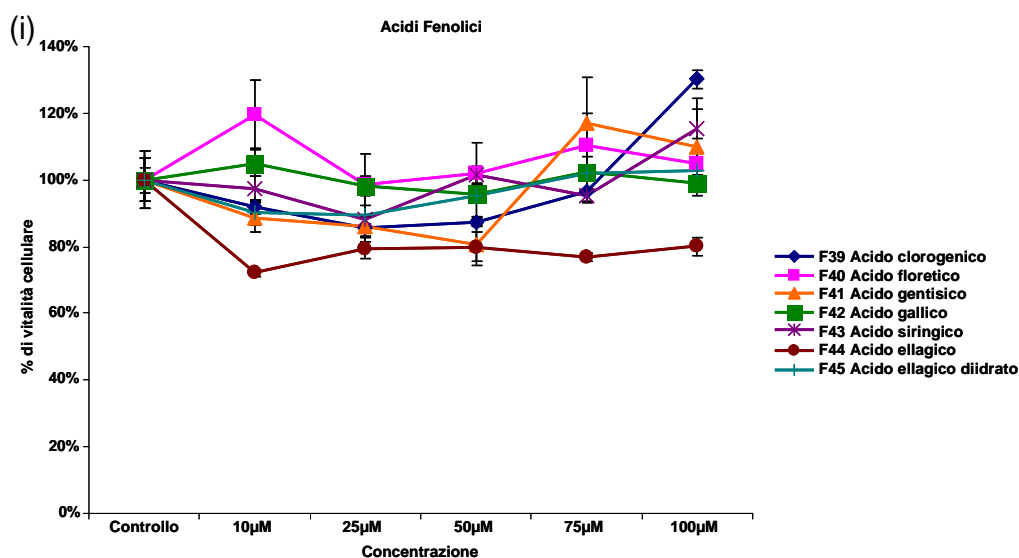


Fig. 14: Risultati test MTT sui melanociti umani normali: (i) Acidi Fenolici.

### 3.2 Valutazione dell'attività antiossidante dei flavonoidi su colture di cheratinociti e melanociti umani normali irradiati mediante test dei ROS

In base ai risultati ottenuti, le molecole che avevano superato la fase di screening, sono state sottoposte al test dei ROS per valutare il potenziale antiossidante nei confronti delle specie reattive dell'ossigeno prodotte dalle radiazioni UVB. La dose scelta per l'irradiazione è stata di 50mJ/cm<sup>2</sup>. Dai risultati di questo test, per fare una ulteriore selezione delle sostanze, abbiamo escluso le molecole che non erano in grado di ridurre la produzione dei ROS rispetto al controllo (trattamento solo con raggi UVB) al di sotto dell'80%. La Fig 15 mostra i risultati del test sui CE umani normali. Le sostanze che mostravano un profilo antiossidante migliore erano la luteolina per i flavoni (Fig.15b), il kampferolo per i flavonoli (Fig.15c), la buteina per i calconi (Fig. 15d), l'acido 18β-glicirretinico, l'acido glicirrizico sale d'ammonio, l'aloina e la glabridrina per triterpeni ed antrachinoni (Fig. 15 f-i), l'acido 3-idrossi cinnamico, l'acido caffeico, l'acido 4-idrossi 3-metossi cinnamico, l'acido ferulico, l'acido clorogenico, l'acido gentisico, l'acido gallico, l'acido siringtonico, l'acido ellagico e l'acido ellagico diidrato per gli acidi fenolici (Fig. 15l-m).

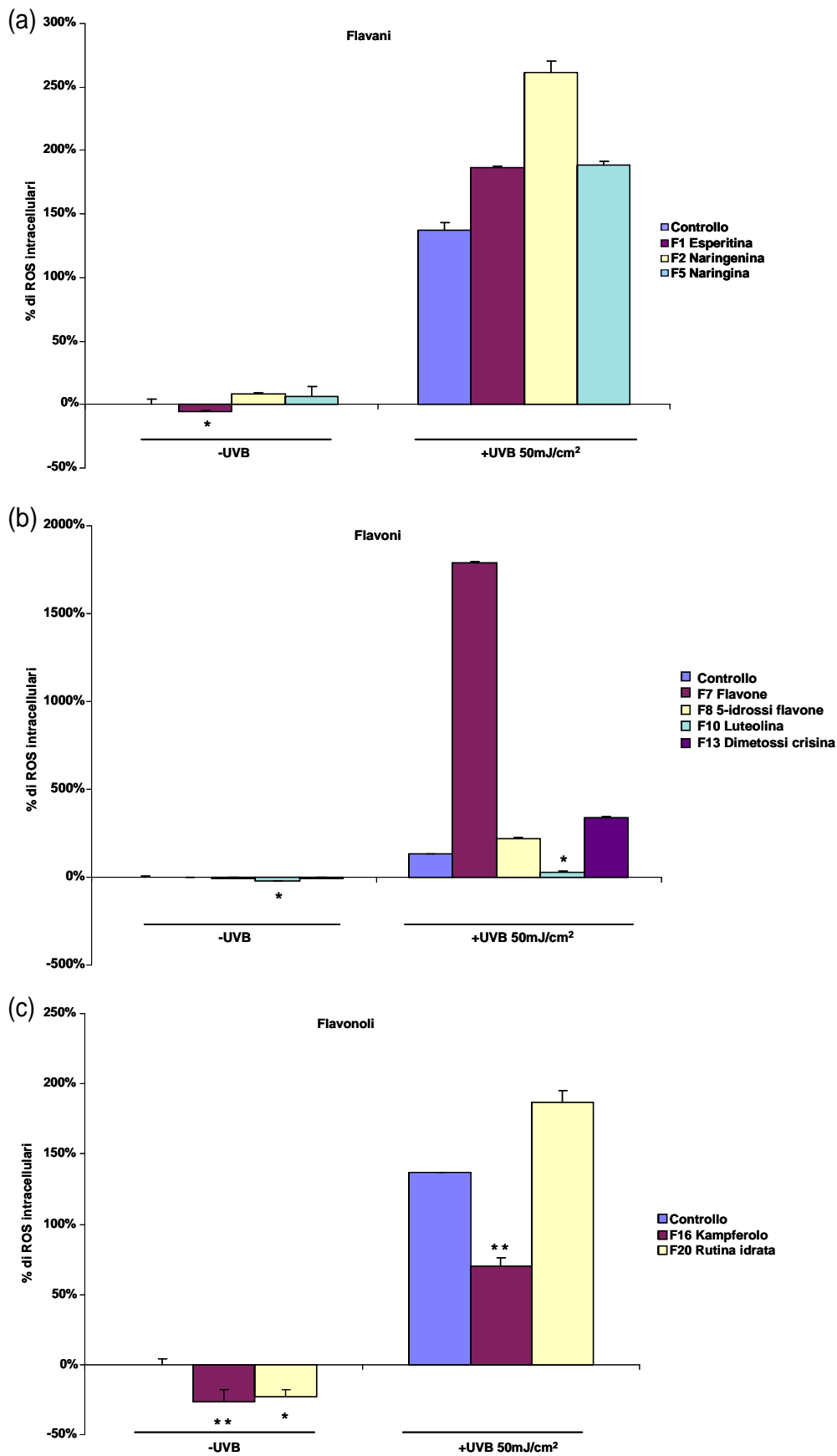


Fig. 15: Risultati del test dei ROS sui cheratinociti umani normali irradiati: (a) Flavani, (b) Flavoni, (c) Flavonoli.

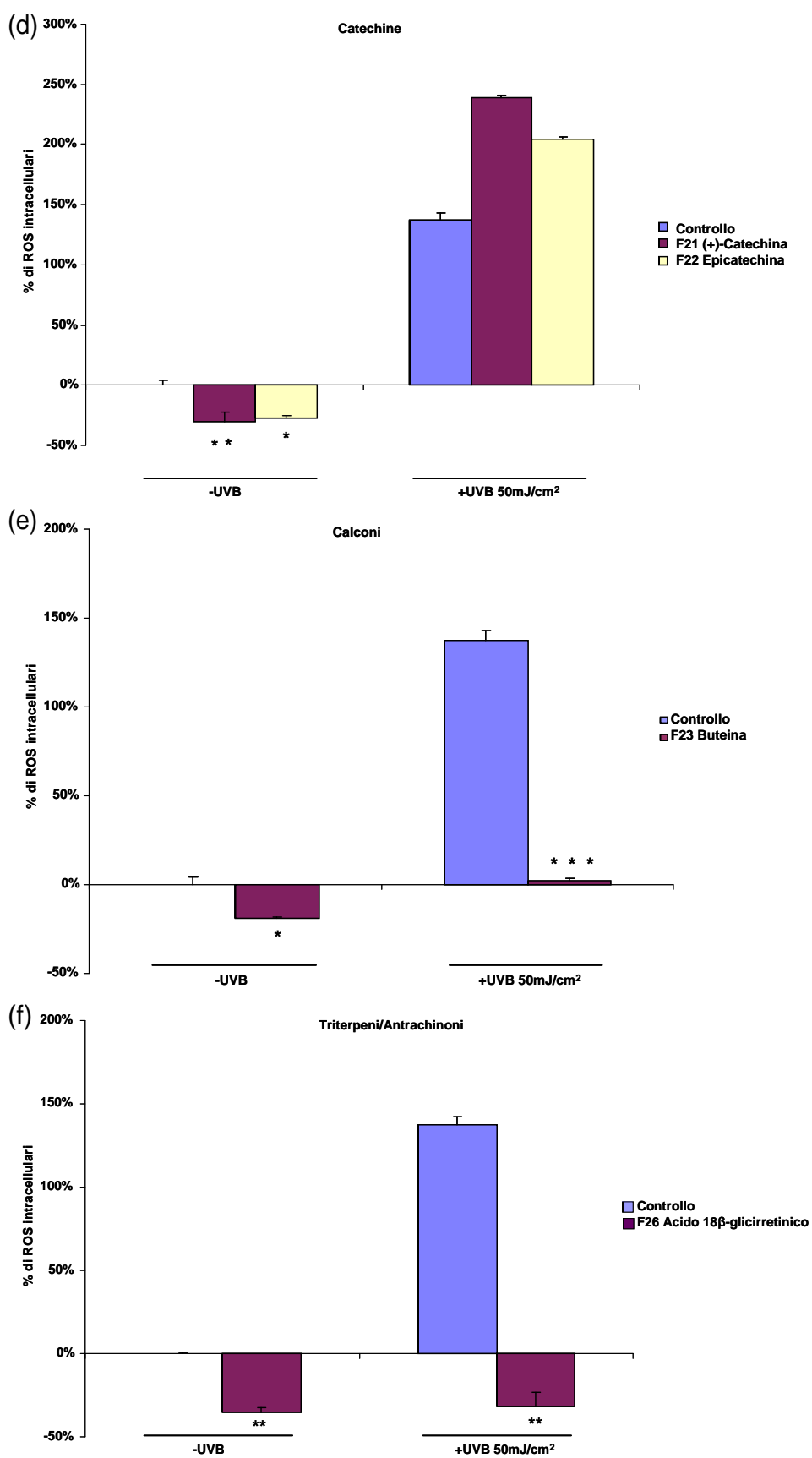


Fig. 15: Risultati del test dei ROS sui cheratinociti umani normali irradiati: (d) Catechine, (e) Calconi, (f) Triterpeni/Antrachinoni.

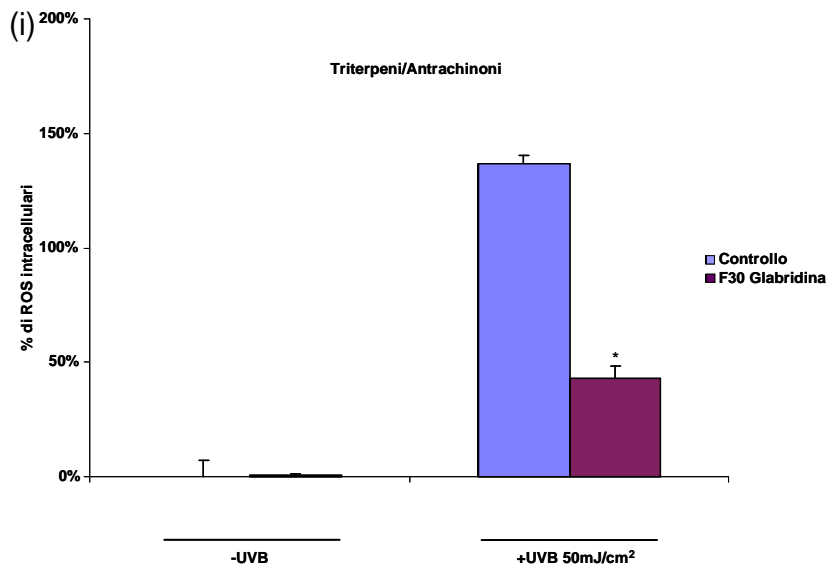
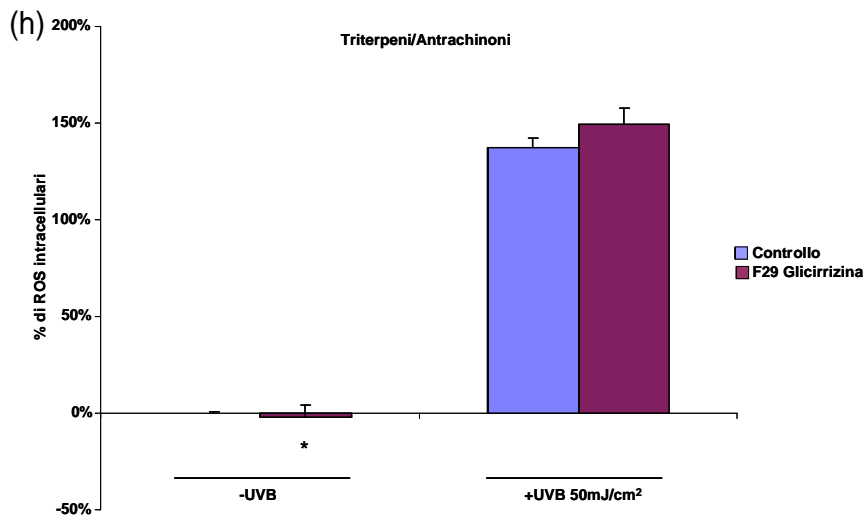
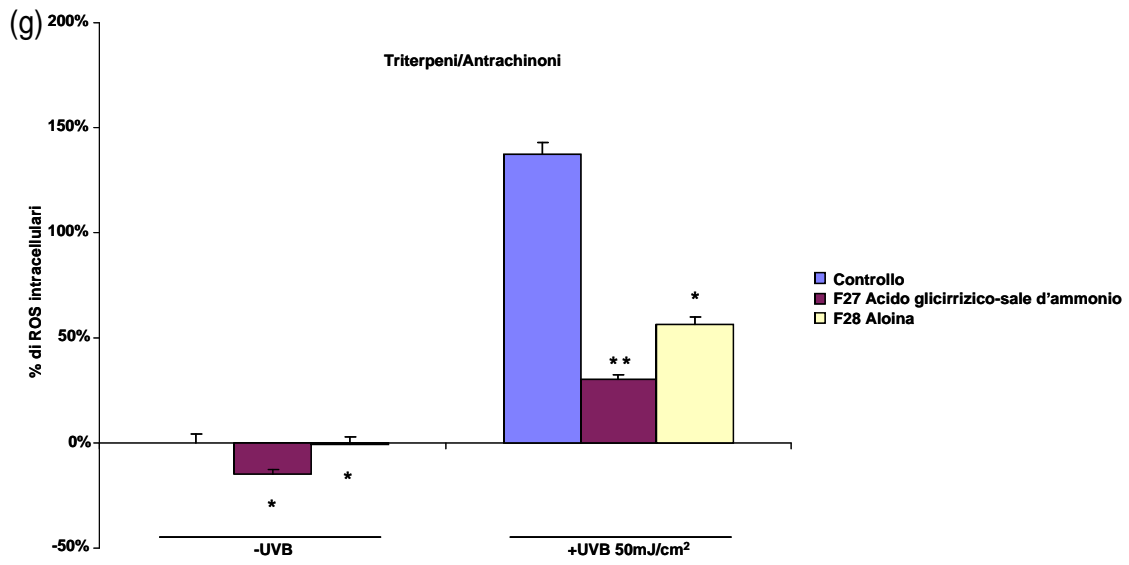


Fig. 15: Risultati del test dei ROS sui cheratinociti umani normali irradiati: (g) (h) (i) Triterpeni/Antrachinoni.

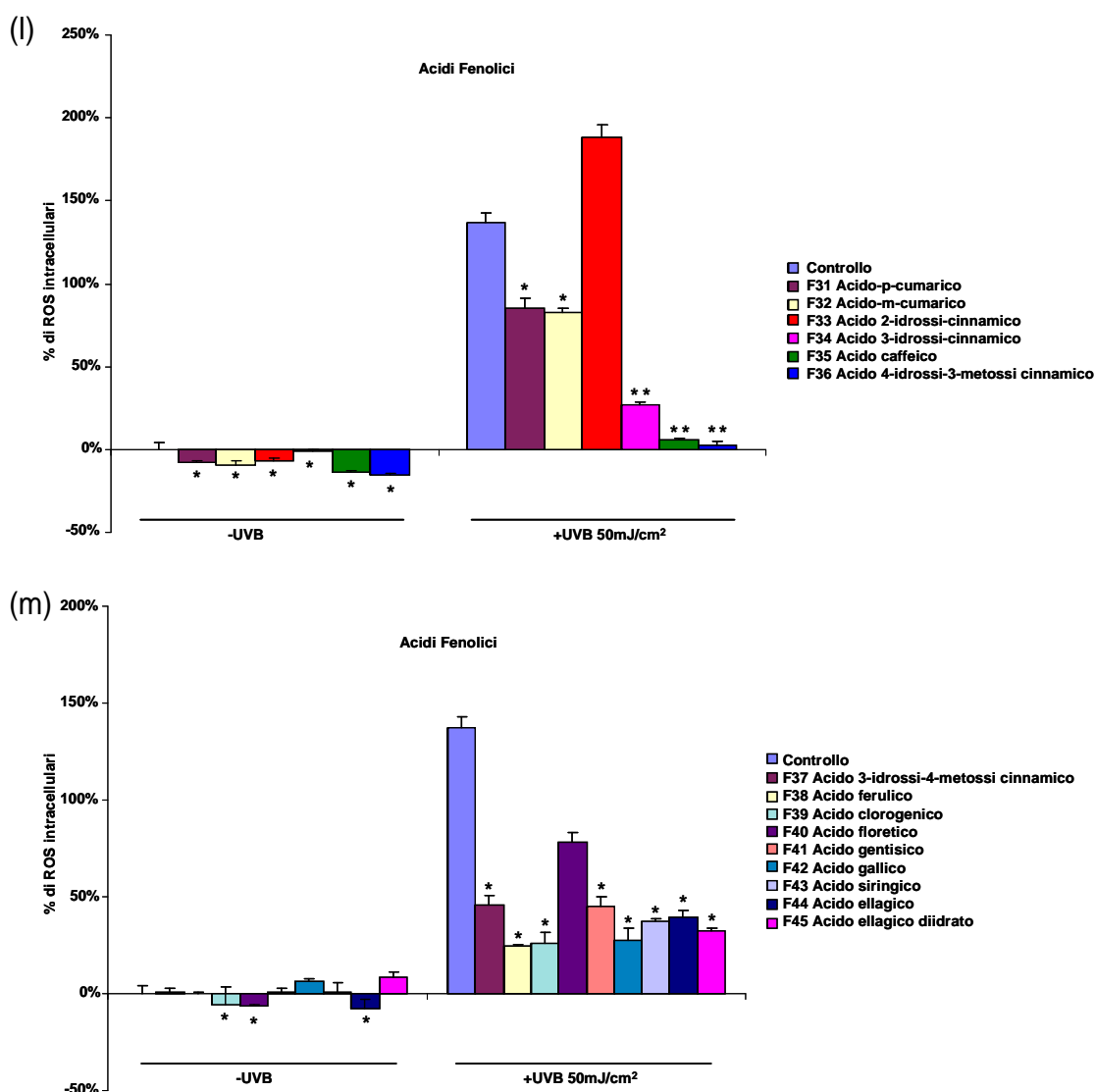


Fig.15: Risultati test dei ROS sui cheratinociti umani normali irradiati: Acidi Fenolici

Nel caso dei melanociti umani normali invece le molecole più interessanti sono risultate la neoeriocitrina per i flavani (Fig. 16a), il kampferolo, la quercitrina e la rutina idrata per i flavonoli (Fig. 16c), la +(-)catechina per le catechine (Fig. 16d), la buteina per i calconi (Fig. 16e), l'acido 18 $\beta$ -glicirretinico e la glabridrina per i triterpeni/antrachinoni (Fig. 16f). Inoltre è stato osservato in entrambe le linee cellulari testate che alcune delle molecole prese in esame non solo riducono la produzione di ROS nelle cellule irradiate, ma anche in quelle non irradiate. Questo presuppone l'esistenza di un effetto protettivo delle stesse sostanze nei confronti della produzione fisiologica di ROS.

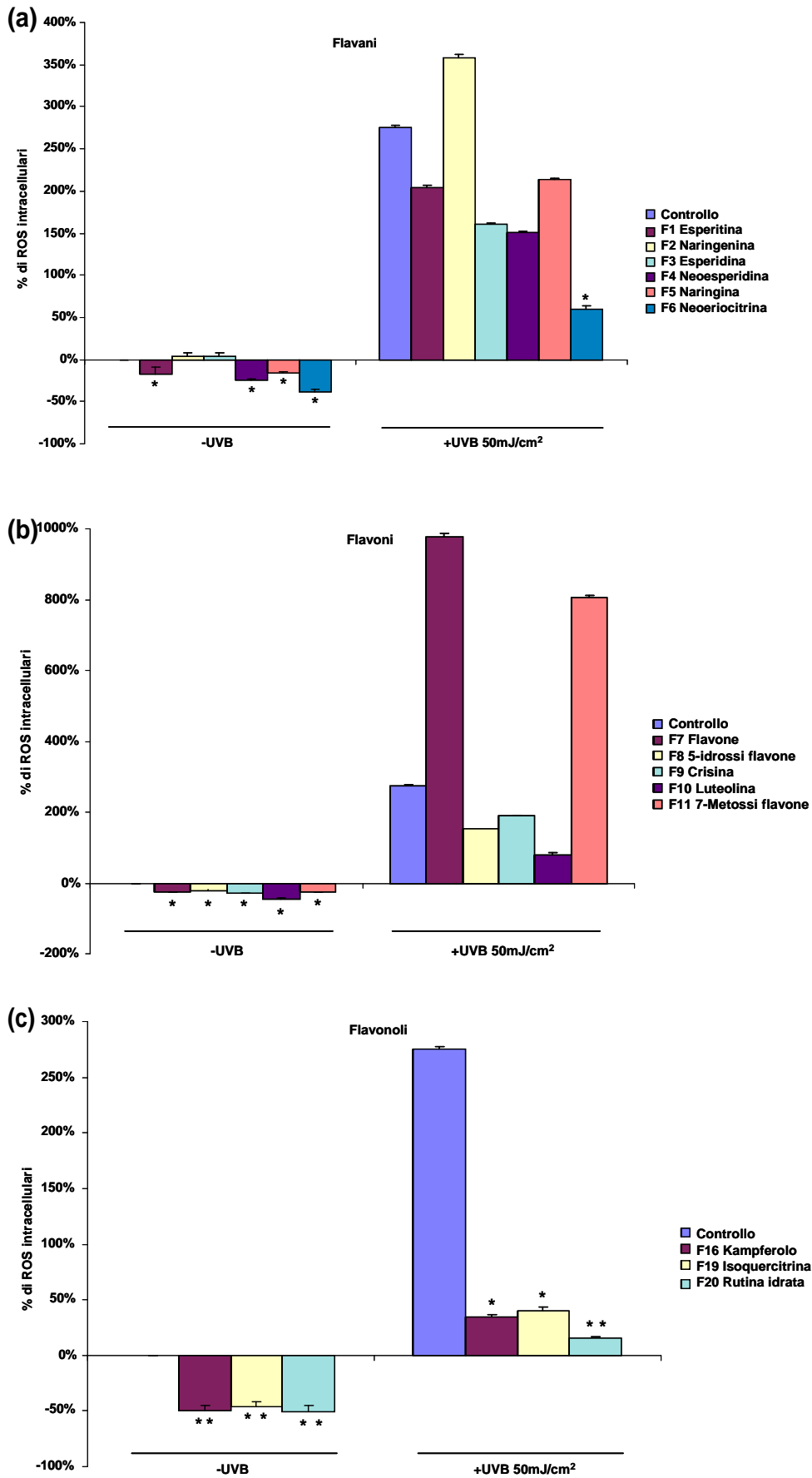


Fig. 16: Risultati del test dei ROS sui melanociti umani normali irradiati: (a) Flavani, (b) Flavoni, (c) Flavonoli.

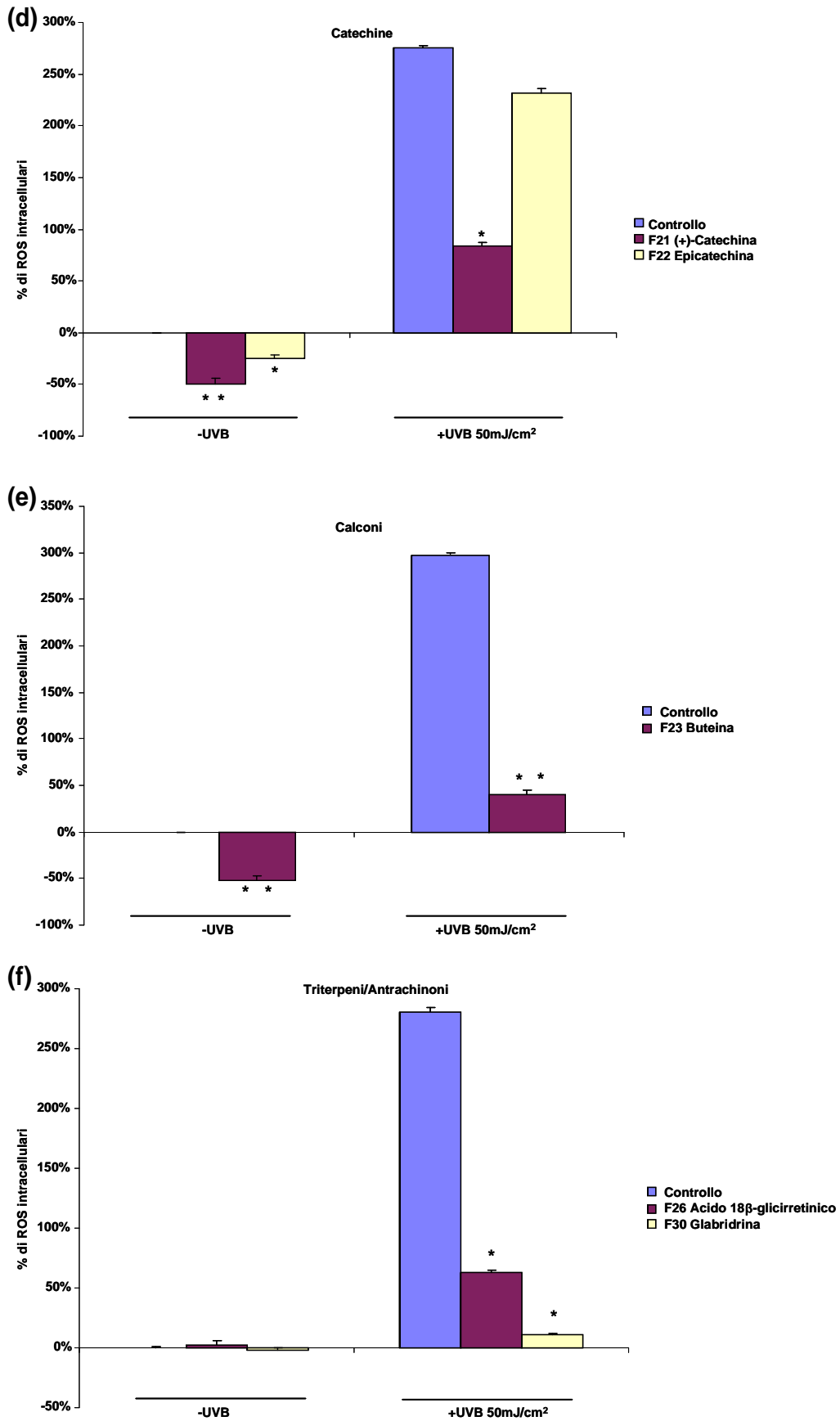


Fig. 16: Risultati del test dei ROS sui melanociti umani normali irradiati: (d) Catechine, (e) Calconi, (f) Triterpeni/Antrachinoni.

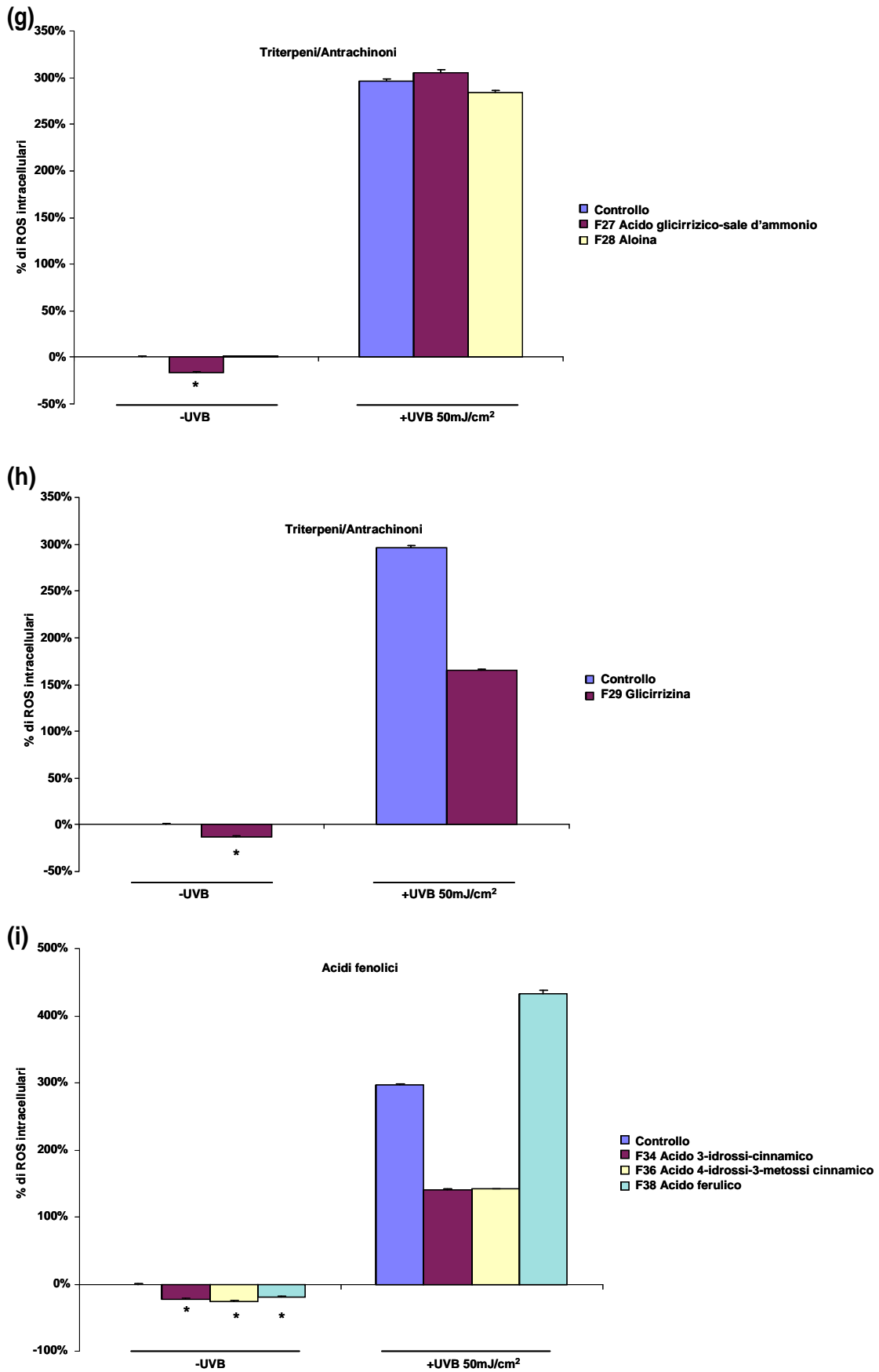


Fig. 16: Risultati del test dei ROS sui melanociti umani normali irradiati: (g) (h) Triterpeni/ Antrachinoni, (i) Acidi Fenolici.

(I)

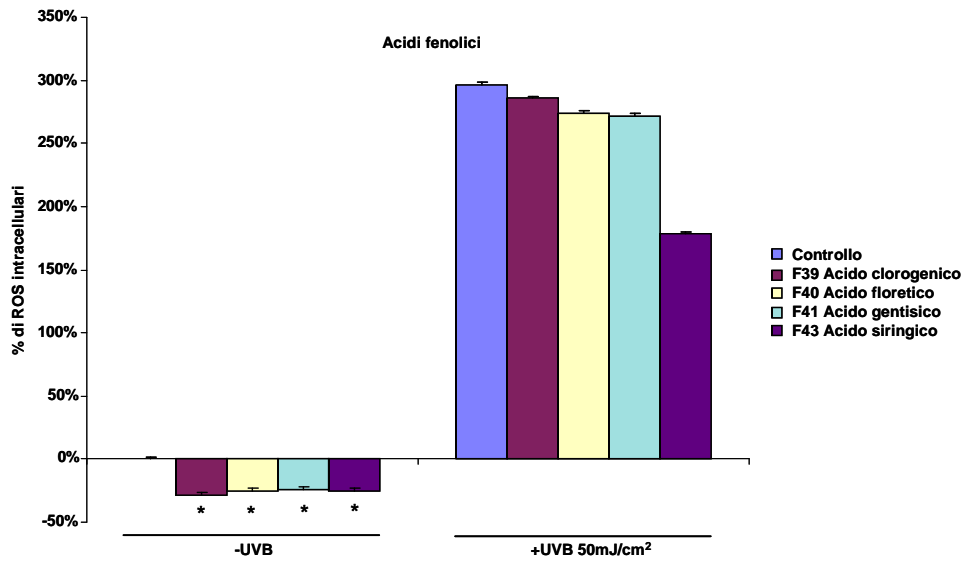
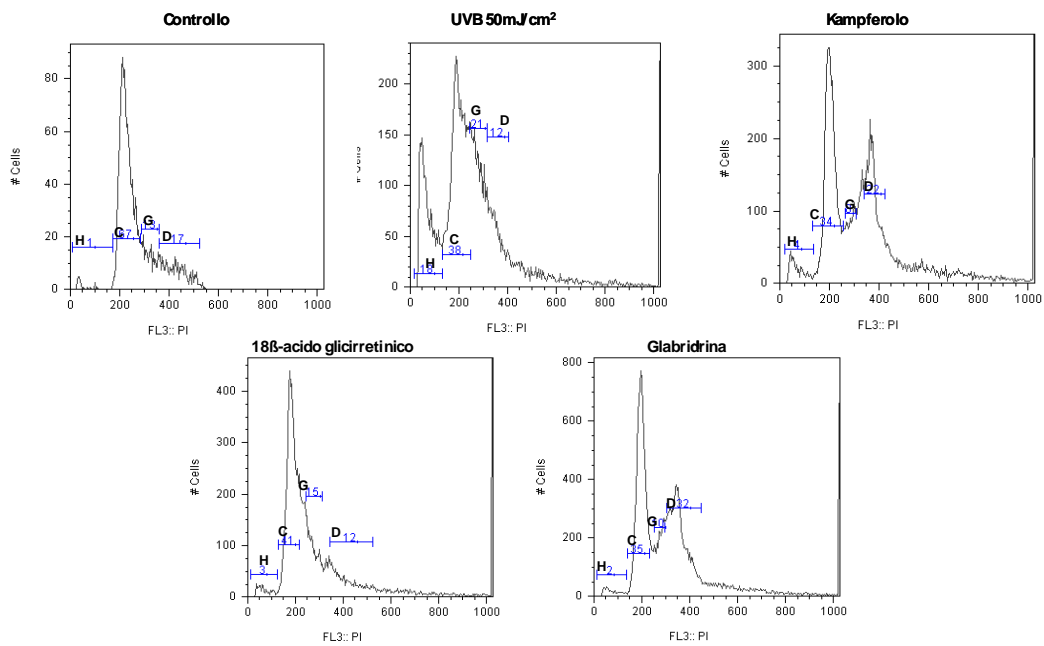


Fig. 16: Risultati test ROS su melanociti umani normali irradiati: (I) Acidi Fenolici.

### **3.3 Il blocco del ciclo cellulare indotto dagli UVB viene inibito in seguito al trattamento con kampferolo, acido 18 $\beta$ -gliciretinico e glabridrina**

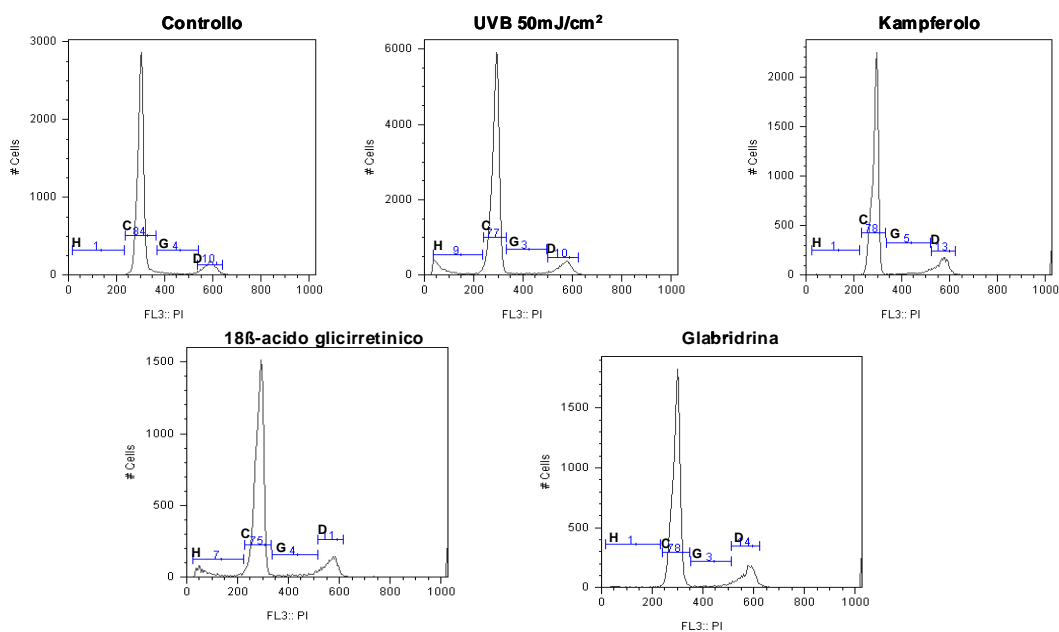
Sebbene un discreto numero di molecole hanno dimostrato un profilo tossicologico ed antiossidante interessante, dai risultati dei test è emerso che i flavonoidi kampferolo, acido 18 $\beta$ -gliciretinico e glabridrina si comportano allo stesso modo sia sui cheratinociti che sui melanociti umani normali irradiati. I successivi esperimenti si sono quindi concentrati solo su queste tre molecole cercando di capire quali fossero i possibili meccanismi d'azione. Come prima cosa è stato quindi valutato l'effetto a livello del ciclo cellulare e a tale scopo è stata effettuata un'analisi monoparametrica mediante citofluorimetro. Attraverso questo test è possibile visualizzare le cellule nelle varie fasi del ciclo cellulare. In particolare si distinguono le cellule in fase G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> nella regione C a sinistra del grafico rappresentato in Fig. 17; centralmente si posizionano le cellule in fase S (regione G del grafico), mentre a destra nella regione D si trovano le cellule in fase G<sub>2</sub>-M. Le cellule in fase apoptotica si distribuiscono invece a sinistra del grafico in una regione chiamata H. Nel caso dei cheratinociti umani normali in seguito al trattamento con i raggi UVB alla dose di 50mJ/cm<sup>2</sup> si ha un aumento evidente delle cellule in fase apoptotica (18%, regione H Fig. 17) che diminuisce in seguito al trattamento con il kampferolo (4%), l'acido 18 $\beta$ -glicirretinico (3%) e la glabridrina (2%) rispetto al solo trattamento con gli UVB.



**Fig. 17** Risultati analisi citofluorimetrica dei melanociti umani in seguito a trattamento con UVB alla dose di 50mJ/cm<sup>2</sup> e dopo trattamento con kampferolo, acido 18β-glicirretinico e glabridrina.

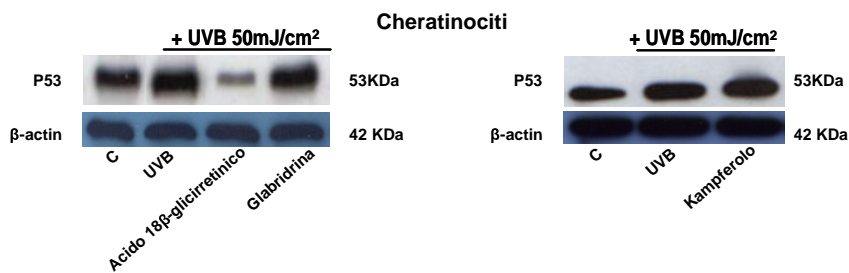
Anche nel caso dei melanociti umani normali dopo trattamento con UVB alla dose di  $50\text{mJ}/\text{cm}^2$ , la percentuale di cellule in fase apoptotica è del 9,2% rispetto al controllo (0,4%).

In seguito al trattamento con il kampferolo, l'acido  $18\beta$ -glicirretinico e la glabridrina la percentuale di cellule in apoptosi diminuisce (rispettivamente 0,68%, 7,11% e 0,92%) rispetto al valore di 11,2% rilevato dopo trattamento solo con i raggi UVB (Fig. 18).

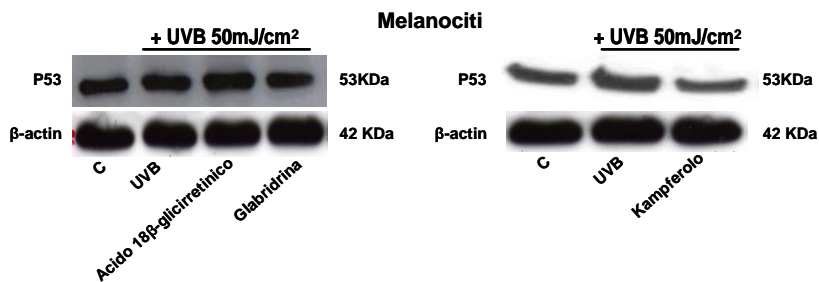


**Fig. 18: Risultati analisi citofluorimetrica dei melanociti umani normali in seguito a trattamento con UVB alla dose di  $50\text{mJ}/\text{cm}^2$  e dopo trattamento con kampferolo, acido  $18\beta$ -glicirretinico e glabridrina.**

Il ruolo del kampferolo, dell'acido 18 $\beta$ -glicirretinico e della glabridrina sul ciclo cellulare è stato confermato anche mediante analisi western-blot. In questo caso è stata valutata l'espressione delle proteine p53 e p21. In seguito ad esposizione ai raggi UVB alla dose di 50mJ/cm<sup>2</sup> sia nei cheratinociti che nei melanociti umani normali è evidente un aumento dei livelli di p53 (Fig. 19a e 19b). In seguito al trattamento con il kampferolo e la glabridrina i livelli proteici di p53 rimangono simili a quelli del controllo mentre nel caso del trattamento con l'acido 18 $\beta$ -glicirretinico i livelli di p53 calano in maniera considerevole nel caso dei cheratinociti, mentre rimangono simili a quelli del controllo nel caso dei melanociti.



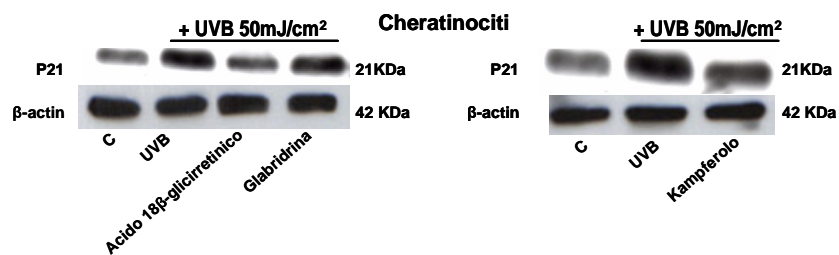
(a)



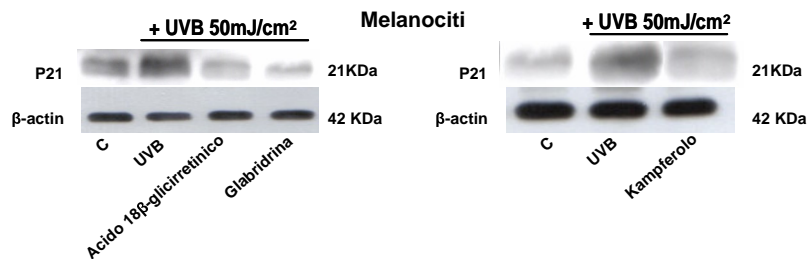
(b)

Fig.19: Analisi mediante western blot dei livelli della proteina p53 in seguito a trattamento con raggi UVB alla dose di 50mJ/cm<sup>2</sup> e dopo trattamento con kampferolo, acido 18 $\beta$ -glicirretinico e glabridrina.

Nella Fig. 20 è mostrata invece la modulazione della proteina p21. In seguito al trattamento con i raggi UVB alla dose di  $50\text{mJ}/\text{cm}^2$  si ha l'up-regulation dei livelli di p21 che diminuiscono invece dopo trattamento con le tre sostanze in esame. I risultati coincidono in entrambe le colture cellulari studiate (Fig. 20a e b).



(a)



(b)

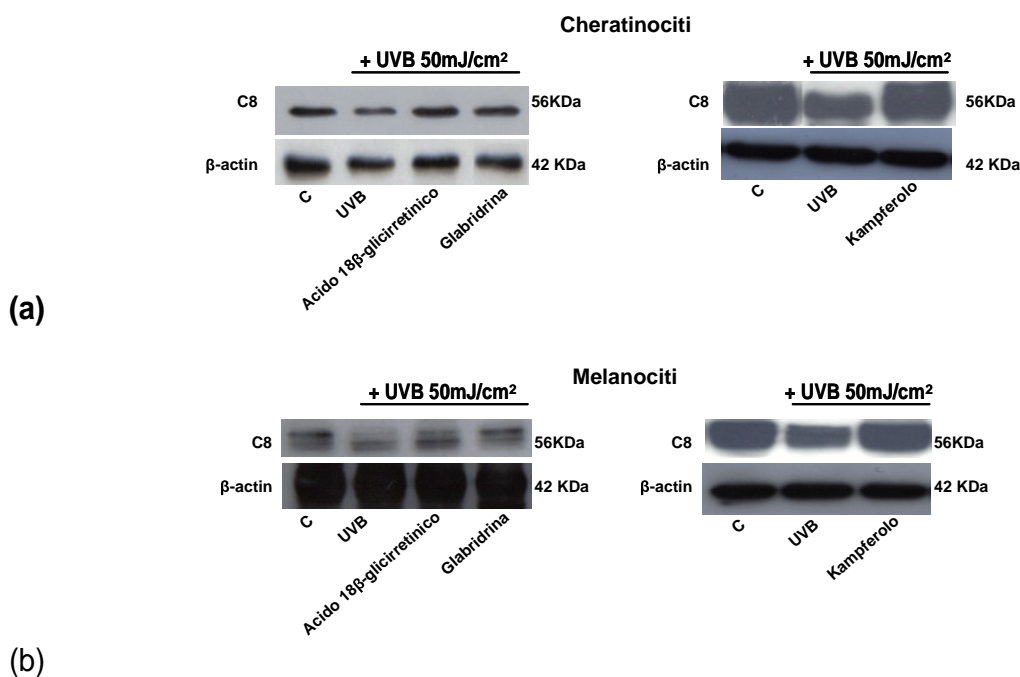
**Fig. 20:** Analisi mediante western blot dei livelli della proteina p21 in seguito a trattamento con raggi UVB alla dose di  $50\text{mJ}/\text{cm}^2$  e dopo trattamento con kampherolo, acido  $18\beta$ -glicirretinico e glabridrina.

### 3.4 Il kampferolo, l'acido 18 $\beta$ -glicirretinico e la glabridrina sono in grado di ridurre l'apoptosi indotta dagli UVB

L'attività inibitoria delle sostanze in esame è stata valutata mediante tecnica western blot e come marker del pathway apoptotico sono stati valutati marker specifici delle due principali vie apoptotiche (intrinseca ed estrinseca) e marker degli effettori finali del processo apoptotico.

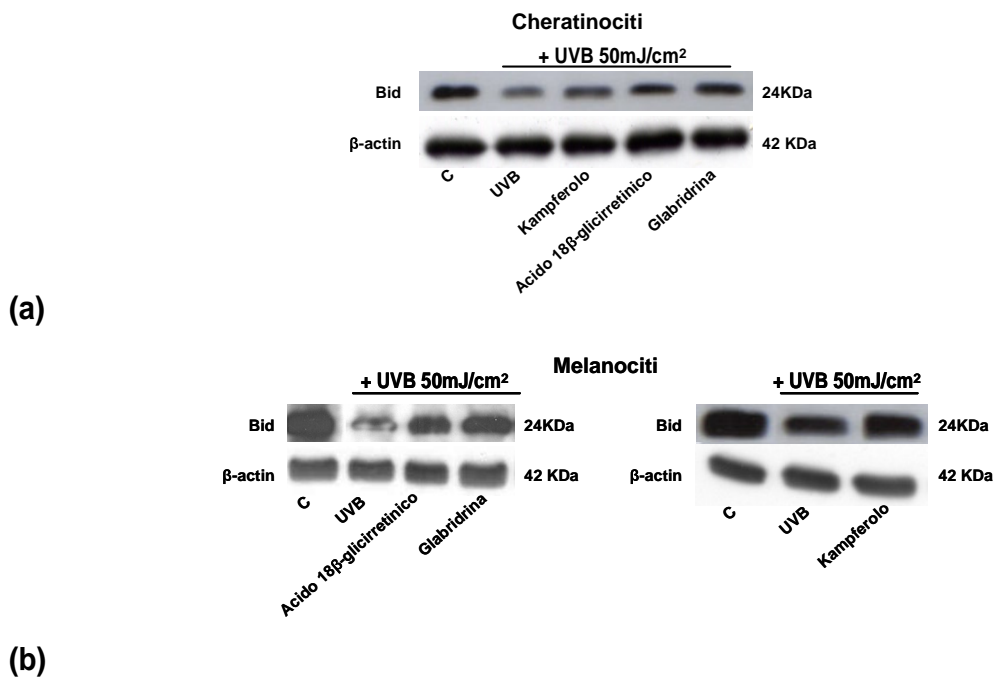
La Fig. 21 mostra i risultati ottenuti nei cheratinociti e nei melanociti per quanto riguarda le principali proteine implicate nell'attivazione della via estrinseca: la caspasi-8 e bid.

La caspasi-8 risulta clivata dopo trattamento con gli UVB alla dose di 50mJ/cm<sup>2</sup> sia sui cheratinociti (Fig. 21a) che sui melanociti umani normali (Fig. 21b). Dopo trattamento con il kampferolo, l'acido 18 $\beta$ -glicirretinico e la glabridrina la caspasi-8 risulta meno clivata dimostrando quindi l'azione protettiva di queste molecole.



**Fig. 21:** Analisi mediante western blot dei livelli della proteina caspasi 8 in seguito a trattamento con raggi UVB alla dose di 50mJ/cm<sup>2</sup> e dopo trattamento con kampferolo, acido 18 $\beta$ -glicirretinico e glabridrina.

Per quanto concerne invece la proteina Bid, implicata nell'attivazione della via intrinseca attraverso quella estrinseca, i risultati sono mostrati nella Fig. 22. La proteina Bid risulta clivata dopo trattamento con i raggi UVB sia nei cheratinociti (Fig. 22a) che nei melanociti umani normali (Fig. 22b). Il trattamento con il kampferolo, l'acido 18 $\beta$ -glicirretinico e la glabridrina riduce invece il divaggio di Bid rispetto al solo trattamento con gli UVB in entrambe le linee cellulari studiate.



**Fig. 22** Analisi mediante western blot dei livelli della proteina bid in seguito a trattamento con raggi UVB alla dose di 50mJ/cm<sup>2</sup> e dopo trattamento con kampferolo, acido 18 $\beta$ -glicirretinico e glabridrina.

Per lo studio della via intrinseca sono stati valutati la down regolazione della proteina bcl-2 e il divaggo della caspasi 9. La Fig. 23 mostra i risultati per quanto riguarda la proteina bcl-2. In seguito al trattamento con i raggi UVB si ha una chiara down-regolazione dei livelli di bcl-2 che diminuisce dopo trattamento con le tre sostanze in esame sia sui cheratinociti (Fig. 23a) che sui melanociti (Fig. 23b).

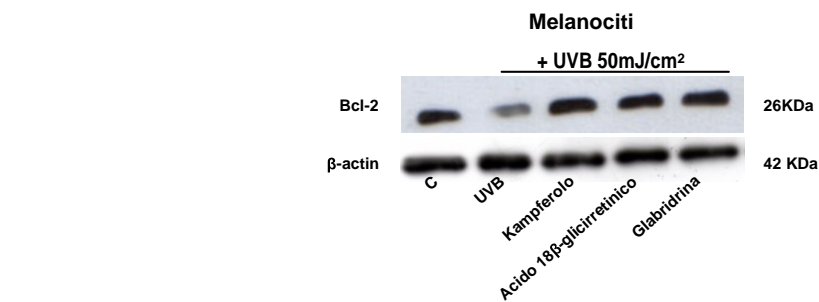
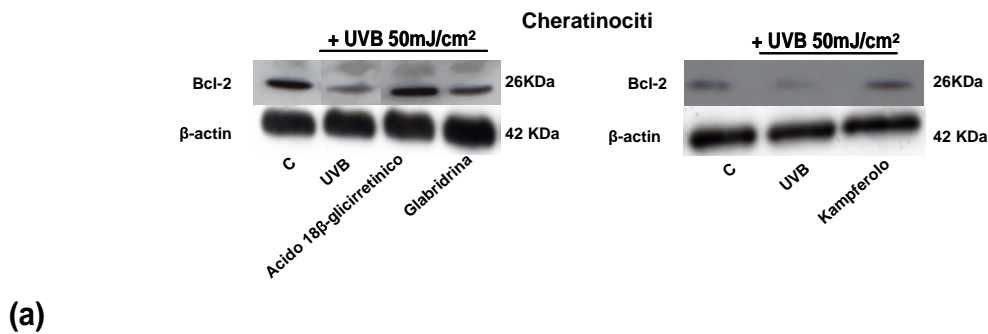


Fig.23 Analisi mediante western blot dei livelli della proteina bcl-2 in seguito a trattamento con raggi UVB alla dose di 50mJ/cm<sup>2</sup> e dopo trattamento con kamferolo, acido 18 $\beta$ -glicirretinico e glabridrina.

Anche la caspasi 9 è coinvolta nell'attivazione del processo apoptotico indotto da UVB sia nei cheratinociti (Fig. 24a) che nei melanociti umani normali (Fig. 24b). Come mostra la Fig. 24 il divaggio della caspasi diminuisce in seguito al trattamento con il kampferolo, l'acido 18 $\beta$ -glicirretinico e la glabridrina rispetto al solo trattamento con gli UVB.

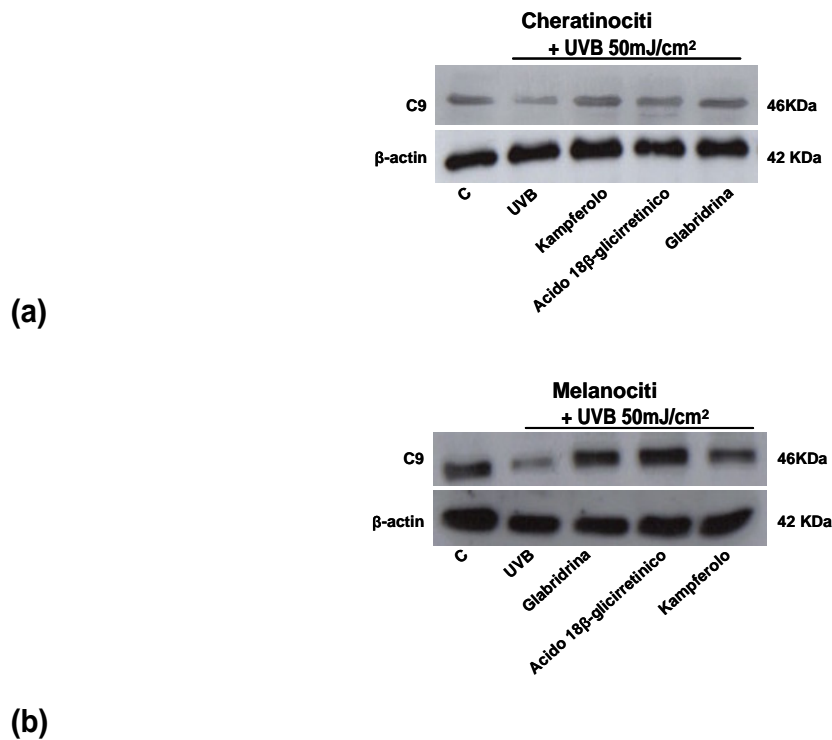


Fig. 24 Analisi mediante western blot dei livelli della proteina caspasi 9 in seguito a trattamento con raggi UVB alla dose di 50mJ/cm<sup>2</sup> e dopo trattamento con kampferolo, acido 18 $\beta$ -glicirretinico e glabridrina.

Come effetto finale del processo apoptotico è stato invece valutato il divaggio della proteina PARP. La Fig. 25 mostra un chiaro divaggio della proteina PARP dopo trattamento con i raggi UVB. Questo divaggio risulta diminuito dopo trattamento con le tre sostanze in esame sia nei cheratinociti che nei melanociti umani normali.

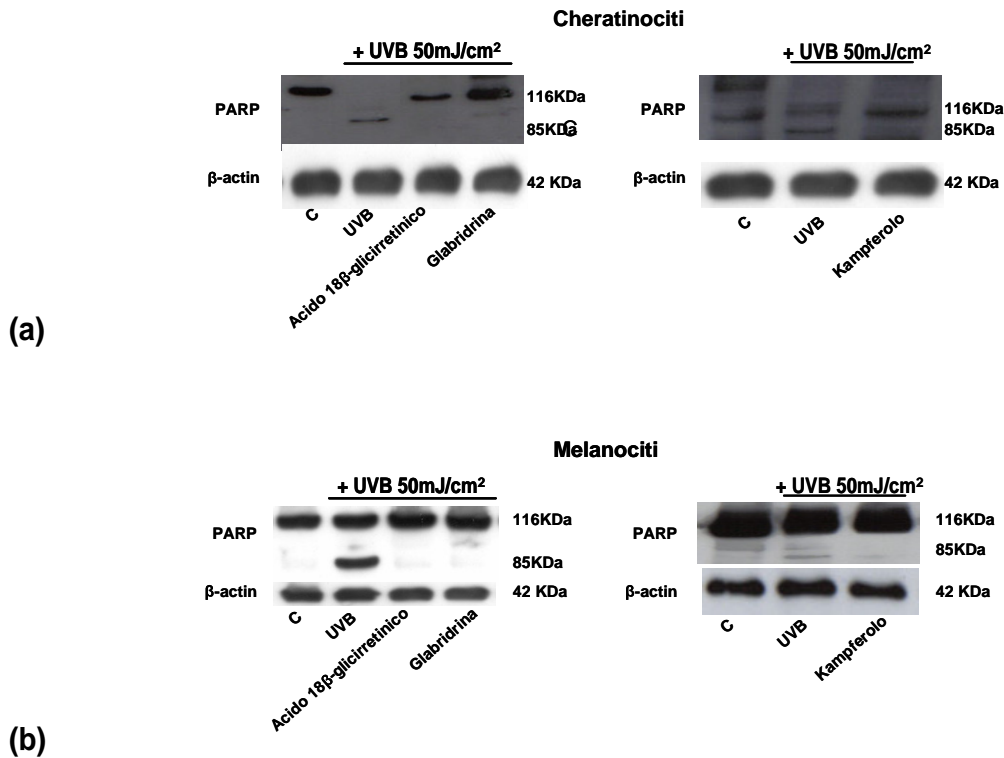


Fig. 25 Analisi mediante western blot dei livelli della proteina PARP in seguito a trattamento con raggi UVB alla dose di 50mJ cm<sup>2</sup> e dopo trattamento con kampherolo, acido 18β-glicirretinico e glabridrina. Il simbolo "+" indica la concomitante presenza dei raggi UVB alla dose di 50mJ/cm<sup>2</sup>.

## **4.Discussione**

Lo spettro di energia della radiazione solare che raggiunge la superficie terrestre ha il massimo di assorbimento nella regione del visibile cioè per lunghezze d'onda maggiori di 400 nm e poi decresce fino a lunghezze d'onda inferiori a 290 nm. I raggi UVC ad alta energia sono completamente assorbiti dallo strato di ozono anche se negli ultimi anni a causa dell'aumento dell'inquinamento si è assistito ad un progressivo assottigliamento di questa fascia. Le radiazioni ultraviolette (UV) ad alta energia classificate come UVA e UVB sono quelle considerate più dannose per gli organismi viventi. Solo recentemente si è raggiunta la consapevolezza degli effetti che gli UVA causano a livello cutaneo. Essi infatti hanno un maggior potere di penetrazione rispetto agli UVB e sono in grado di raggiungere il derma causando alterazioni strutturali importanti nel processo di invecchiamento cutaneo. Sono anche responsabili dell'attivazione di reazioni fotoallergiche, soprattutto in seguito all'assunzione di alcuni farmaci (Lippens et al., 2009). Sono caratterizzati da alta genotossicità, anche se, la genotossicità degli UVA non è diretta ma sembra essere indotta dai radicali reattivi dell'ossigeno (ROS).

Gli UVB rappresentano circa il 5% della radiazione ultravioletta che arriva al suolo e a differenza degli UVA sono dotati di minore capacità di penetrazione nella pelle arrestandosi quindi a livello dell'epidermide dove essendo assorbiti direttamente dal DNA causano danni al patrimonio genetico delle cellule (Van Laethem et al., 2009). Gli UVB sono quindi considerati i maggiori responsabili dei processi di fotocarcinogenesi cutanea.

Negli ultimi anni abbiamo assistito ad un significativo incremento delle patologie derivanti dai danni da UVA e UVB. Il melanoma ad esempio è responsabile del 20% dei decessi annui totali su un totale di 40000 casi diagnosticati (Rass et al., 2008). Questo dipende da vari fattori quali l'assottigliamento dello strato di ozono, l'impossibilità di evitare l'esposizione

quotidiana al sole e l'aumento dei periodi di esposizione soprattutto nei mesi estivi (Moan et al., 2008).

Attualmente la miglior protezione attuabile nei confronti delle radiazioni UV viene data dall'uso costante di schermi o filtri solari contenuti nei prodotti cosmetici anti-sole (anche se ancora oggi esistono molti fattori di limitazione all'indice di protezione assicurata) e da una esposizione controllata in orari a bassa intensità di radiazione stabiliti anche in base al fototipo cutaneo. Negli ultimi anni l'attenzione di molti studiosi si è focalizzata notevolmente sull'uso di sostanze antiossidanti come agenti fotoprotettivi (Adhami et al., 2008). In effetti esistono molti studi sul come e perché i flavonoidi sono importanti per la nostra salute e la maggior parte convergono nell'affermare che queste molecole sono dei potentissimi antiossidanti candidati come dei potenti agenti protettivi per la salute umana (Katiyar et al., 2008).

Il presente lavoro ha preso in considerazione 45 molecole di origine naturale appartenenti al gruppo dei flavonoidi con lo scopo di individuare nuove molecole utilizzabili per la protezione cellulare da radiazioni ultraviolette. I test sono stati effettuati su cheratinociti e melanociti umani normali estratti da cute di pazienti sani mediante la metodica originariamente descritta da Rheinwald e Green (1975).

Inizialmente lo studio è stato focalizzato sulla valutazione dell'effetto antiaproliferativo e antiossidante di queste molecole sui cheratinociti e melanociti umani normali esposti a irradiazione ultravioletta. A questo scopo si è reso necessario effettuare prima uno screening tossicologico tramite test MTT per valutare la tossicità di tali sostanze su entrambe le linee cellulari e per stabilire un range di concentrazioni non tossiche.

I risultati di questo test hanno messo in luce che i flavonoidi non mostrano eventi di tossicità rilevanti per i cheratinociti e i melanociti umani normali.

Delle 45 molecole inizialmente considerate solo 33 nel caso dei cheratinociti apparivano meno tossiche: l'esperitina, la naringenina e la naringina per i flavani; il flavone, il 5-idrossi flavone, la luteolina e la dimetossi crisina per i flavoni; il kampferolo e la rutina idrata per i flavonoli; la +(-) catechina e l'epicatechina per le catechine; la buteina per i calconi; l'acido 18 $\beta$ -glicirretinico, l'acido glicirrizico-sale d'ammonio, l'aloina, la glicirrizina e la glabridrina per triterpeni ed antrachinoni; tutti gli acidi fenolici. Nel caso dei melanociti umani normali invece dopo test MTT le sostanze che hanno mostrato un profilo tossicologico interessante sono state solo 29: tutti i flavani; il flavone, il 5-idrossi flavone, la crisina, la luteolina, il 7-metossi flavone per i flavoni; il kampferolo, l'isoquercitrina e la rutina idrata per i flavonoli; la +(-)catechina e l'epicatechina per le catechine; la buteina per i calconi; l'acido 18 $\beta$ -glicirretinico, l'acido glicirrizico-sale d'ammonio, l'aloina, la glicirrizina e la glabridina per triterpeni ed antrachinoni; l'acido 3-idrossi cinnamico, l'acido 4-idrossi 3-metossi cinnamico, l'acido ferulico, l'acido dorogenico, l'acido floretico, l'acido gentisico e l'acido siringico per gli acidi fenolici.

Sebbene dopo questa prima fase di screening un certo numero di molecole siano state scartate questo non significa che questi composti non possono essere dotati di proprietà benefiche che le rendono interessanti per altri tipi di studi.

Poiché è noto che il danno al DNA mediato dai raggi UV può essere sia diretto che indiretto (mediato dai ROS) (Ravanat et al., 2001), la successiva fase di screening è stata condotta mediante valutazione dell'attività antiossidante di queste sostanze dopo trattamento con raggi UVB. A questo scopo è stato utilizzato il test dei ROS, un test che valuta la produzione intracellulare delle specie reattive dell'ossigeno. La dose scelta per l'irradiazione è stata di 50mJ/cm<sup>2</sup>. Dai risultati di questo test, per fare una ulteriore selezione delle sostanze, sono state escluse le molecole che non erano in grado di ridurre la

produzione dei ROS rispetto al controllo (trattamento solo con raggi UVB) al di sotto dell'80%. In questo modo nel caso dei cheratinociti umani normali le sostanze che mostravano un profilo antiossidante migliore erano solo 17: la luteolina per i flavoni; il kampferolo per i flavonoli; la buteina per i calconi; l'acido 18 $\beta$ -glicirretinico, l'acido glicirrizico sale d'ammonio, l'aloina e la glabridrina per triterpeni ed antrachinoni; l'acido 3-idrossi cinnamico, l'acido caffeico, l'acido 4-idrossi 3-metossi cinnamico, l'acido ferulico, l'acido clorogenico, l'acido gentisico, l'acido gallico, l'acido siringico, l'acido ellagico e l'acido ellagico diidrato per gli acidi fenolici. Nel caso dei melanociti umani normali invece le molecole più interessanti sono state solo 8: la neoeriocitrina per i flavani; il kampferolo, la quercitrina e la rutina idrata per i flavonoli; la (+/-)catechina per le catechine; la buteina per i calconi; l'acido 18 $\beta$ -glicirretinico e la glabridrina per i triterpeni/antrachinoni. Inoltre è stato osservato che alcune delle molecole prese in esame non solo riducono la produzione di ROS nelle cellule irradiate, ma anche in quelle non irradiate presupponendo l'esistenza di un effetto protettivo delle stesse sostanze nei confronti della produzione fisiologica di ROS.

Sebbene un discreto numero di molecole hanno dimostrato un profilo tossicologico ed antiossidante interessante, dai risultati dei test è emerso che solo i flavonoidi kampferolo, acido 18 $\beta$ -glicirretinico e glabridrina si comportano allo stesso modo sia sui cheratinociti che sui melanociti umani normali irradiati. La fase successiva di questo studio si è quindi concentrata solo su queste tre molecole cercando di capire quali fossero i principali meccanismi d'azione.

Sia nei cheratinociti che nei melanociti umani normali in seguito all'esposizione ai raggi UVB viene indotta l'attività del gene p53. La quantità della proteina p53 aumenta rapidamente nelle cellule irradiate bloccando l'espressione dei geni "effettori" e arrestando le cellule nella fase G1. L'attivazione dei sistemi di riparo o del programma di apoptosi dopo danno cellulare, dipende da uno o più

segnali di trasduzione e vi sono evidenze sperimentali che indicano che il DNA danneggiato è in grado di produrre uno di questi segnali. Il segnale viene captato dai regolatori del ciclo cellulare o dell'apoptosi che danno inizio alla trascrizione genica con accumulo di proteine appartenenti a diverse classi funzionali (Ryu et al., 2010).

L'analisi mediante citofluorimetria ha dimostrato che sia nei cheratinociti che nei melanociti umani normali il trattamento con i raggi UVB a  $50\text{mJ}/\text{cm}^2$  induce un danno con attivazione del processo apoptotico rispettivamente nell'11% e nel 18% della popolazione cellulare in esame. I flavonoli kampferolo, acido  $18\beta$ -glicirretinico e glabridrina dimostrano invece un effetto protettivo nei confronti del danno indotto da UVB in quanto la percentuale delle cellule in apoptosi rilevate mediante citofluorimetro risulta notevolmente diminuita. Il coinvolgimento del ciclo cellulare è stato dimostrato anche mediante analisi western blot analizzando l'attivazione delle proteine p53 e p21. I risultati di questi test hanno evidenziato un'attività protettiva soprattutto nel caso del kampferolo e della glabridrina in quanto i livelli della proteina p53 sono pari a quelli del controllo e non risultano aumentati come nel caso del trattamento con gli UVB. Nel caso dell'acido  $18\beta$ -glicirretinico invece i livelli di p53 sono aumentati come per gli UVB indicando quindi la presenza di un danno al DNA in corso di riparazione. L'analisi dei livelli di p21, proteina coinvolta nell'attivazione del ciclo cellulare, indica invece che l'apoptosi attivasi in seguito al solo trattamento con gli UVB risulta notevolmente diminuito per le tre sostanze in esame sia nei cheratinociti che nei melanociti umani normali dimostrando quindi un effetto protettivo.

A questo punto la ricerca è proseguita con l'intento di verificare l'eventuale funzione anti-apoptotica di queste molecole e identificare le principali vie implicate nell'azione protettiva di queste sostanze nei confronti del danno indotto da UVB. A questo scopo sono stati valutati i principali marker della via

intrinseca (bcl-2, caspasi 9) e della via estrinseca (caspasi 8, bid) e il principale effettore della fase finale del processo apoptotico (PARP).

I risultati dell'analisi mediante western blot dei livelli di espressione di queste proteine hanno confermato la loro azione protettiva nei confronti del danno indotto dagli UVB in quanto i livelli di ciascuna proteina dopo il trattamento tornano ai valori normali del controllo.

Tenuto conto della maggiore frequenza con cui la popolazione mondiale si espone al sole ed alle segnalazioni della riduzione dello strato di ozono in alcune parti del pianeta, diventa importante fornire agenti protettivi stabili alle radiazioni, da proporre come parte fondamentale nelle formulazioni dei prodotti solari. Il kampferolo, l'acido 18 $\beta$ -glicirretinico e la glabridrina sono bioflavonoli che presentano tutti un residuo fenolico parasostituito. La letteratura internazionale segnala da tempo l'azione antiossidante di molecole di origine naturale appartenenti ai bioflavonoidi, dovuta principalmente alla struttura ricca di doppi legami. Il presente studio ha anche sottolineato la difficoltà di questo tipo di ricerca e soprattutto di individuare molecole che siano efficaci contemporaneamente sia sui cheratinociti che sui melanociti. Nel nostro caso siamo riusciti ad individuare nel kampferolo, nell'acido 18 $\beta$ -glicirretinico e nella glabridrina delle molecole interessanti come potenziali filtri antisolari per la protezione delle cellule epidermiche dai danni indotti dagli UVB. Essi esplicano una azione antiradicalica, in grado di proteggere le strutture cellulari a tutti i livelli ed in particolare proteggono i meccanismi di produzione delle proteine. Inoltre sembra che queste molecole, soprattutto l'acido 18 $\beta$ -glicirretinico, siano in grado di impedire l'ossidazione proteica e lipidica fisiologicamente prodotta dal nostro organismo svolgendo probabilmente un effetto sinergizzante con altri antiossidanti (es. vitamina C) normalmente assunti con la dieta.

## **5. BIBLIOGRAFIA**

Adhami VM, Syed DN, Khan N, Afaq F. **Phytochemicals for prevention of solar ultraviolet radiation-induced damages.** Photochem Photobiol. 2008, 84(2): 489-500.

Agarwal MK, Iqbal M, Athar M. **Inhibitory effect of 18beta-glycyrrhetic acid on 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate-induced cutaneous oxidative stress and tumor promotion in mice.** Redox Rep 2005, 10(3): 151-7.

Ashe Paula C, Berry Mark D: **Apoptotic signalling cascades.** Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry 2003, 27: 199-214.

Bajdik CD, Gallagher RP, Astrakianakis G, Hill GB, Fincham S, McLean DI. **Non-solar ultraviolet radiation and the risk of basal and squamous cell skin cancer.** British Journal of Cancer 1996, 73(12): 1612-4.

Bisht K, Wagner KH, Bulmer AC. **Curcumin, resveratrol and flavonoids as anti-inflammatory, cyto- and DNA-protective dietary compounds.** Toxicology 2009. In press.

Boehme KA, Blattner C. **Regulation of p53-insights into a complex process.** Crit Rev Biochem Mol Biol 2009, 44(6): 367-92.

Borradori L, Sonnenberg A. **Hemidesmosomes: roles in adhesion, signaling and human diseases.** Curr Op Cell Biol 1996, 8,: 647.

Bracewell MF, Zilva SS. **Vitamin C in the orange and the grape fruit.** Biochem J 1931, 25(4): 1081-9.

Briggaman RA. **Epidermal-dermal interactions in adult skin.** J Invest Dermatol 1982, 79 (Suppl 1): 21s-24s.

Brown CJ, Lain S, Verma CS, Fersht AR, Lane DP. **Awakening guardian angels: drugging the p53 pathway.** Nat Rev Cancer 2009, 9(12): 862-73.

Cao C, Wan Y. **Parameters of protection against ultraviolet radiation-induced skin cell damage.** J Cell Physiol 2009, 220(2): 277-84.

Cazzalini O, Scovassi AI, Savio M, Stivala LA, Prosperi E. **Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21(CDKN1A) in the DNA damage response.** Mutat Res 2010, In press.

Cerdá B, Tomás-Barberán FA, Espín JC. **Metabolism of antioxidant and chemopreventive ellagitannins from strawberries, raspberries, walnuts, and oak-aged wine in humans: identification of biomarkers and individual variability.** J Agric Food Chem 2005, 53(2): 227-35.

Chen D, Daniel KG, Kuhn DJ, Kazi A, Bhuiyan M, Li L, Wang Z, Wan SB, Lam WH, Chan TH, Dou QP. **Green tea and tea polyphenols in cancer prevention.** Front Biosci 2004, 9: 2618-31.

Chen M, Wang J. **Initiator caspases in apoptosis signaling pathways.** Apoptosis 7: 313-319, 2002.

Chiu TH, Lai WW, Hsia TC, Yang JS, Lai TY, Wu PP, Ma CY, Yeh CC, Ho CC, Lu HF, Wood WG, Chung JG. **Aloe-emodin induces cell death through S-phase arrest and caspase-dependent pathways in human tongue squamous cancer SCC-4 cells.** Anticancer Res 2009, 29(11): 4503-11.

Cryns V, Yuan J. **Proteases to die for.** Genes Dev. 1998, 12(11): 1551-70.

Daya-Grosjean L, Dumaz N, Sarasin A. **The specificity of p53 mutation spectra in unlight induced human cancers.** Jurnal Photochem Photobiol B 1995, 28: 115.

de Gruijl FR, Rebel H. **Early events in UV carcinogenesis-DNA damage, target cells and mutant p53 foci.** Photochem Photobiol, 2008, 84(2): 382-7.

Dinkova-Kostova AT. **Phytochemicals as protectors against ultraviolet radiation: versatility of effects and mechanisms.** Planta Med 2008, 74(13): 1548-59.

Fguyer, Afaq F, Mukhtar H. **Photochemoprevention of skin cancer by botanical agents.** Photodermatol Photoimmunol Photomed 2003, 19: 56-72.

Matsui MS, DeLeo VA. Longwave ultraviolet radiation and promotion of skin cancer. Cancer Cells 1991, 3(1): 8-12.

Farage MA, Miller KW, Berardesca E, Maibach HI. **Clinical implications of aging skin: cutaneous disorders in the elderly.** Am J Clin Dermatol 2009, 10(2): 73-86.

Filip A, Qichici S, Daicoviciu D, Adriana M, Postescu ID, Perde-Schrepler M, Oteanu D. **Photochemoprevention of cutaneous neoplasia through natural products.** Exp Oncol 2009, 31(1): 9-15.

Fulda S and Debatin KM. **Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy.** Oncogene 2006, 25(34): 4798-811.

Gniadecki R, Hansen M, Wulf HC. **Two pathways for induction of apoptosis by ultraviolet radiation in cultured human keratinocytes.** J Invest Dermatol 1997, 109(2): 163-9.

Gobè G, Harmon B. **Apoptosis morphological criteria and other assay.** Encyclopedia of life sciences. Nature publishing group 2001, 1-6.

Goldberg LH. **Basal cell carcinoma.** Lancet 1996, 347: 663-7.

Gray DT, Suman VJ, Su WDP, Clay RP, Harmsen WS, Roenigk RK. **Trend in the population-based incidence of squamous cell carcinoma of the skin first diagnosed between 1984 and 1992.** Arch Dermatol 1997, 133: 735-40.

Green KJ, Jones JCR. **Desmosomes and hemidesmosomes: structure and function of molecular components.** Faseb Journal, 10, 871, 1996.

Grossman L, Wei Q. **DNA repair and epidemiology of basal cell carcinoma.** Clinical Chemistry 1995, 41: 1854-63.

Gruber F, Kastelan M, Brajac I, Saftić M, Peharda V, Cabrijan L, Stanić Zgombić Z, Smonić E. **Molecular and genetic mechanisms in melanoma.** Coll Antropol 2008, 32 (Suppl 2): 147-52.

Han W, He YY. **Requirement for metalloproteinase-dependent ERK and AKT activation in UVB-induced G1-S cell cycle progression of human keratinocytes.** Photochem Photobiol 2009, 85(4): 997-1003.

Hayashi H, Hosono N, Kondo M, Hiraoka N, Ikeshiro Y, Shibano M, Kusano G, Yamamoto H, Tanaka T, Inoue K. **Phylogenetic relationship of six Glycyrrhiza species based on rbcL sequences and chemical constituents.** Biol Pharm Bull 2000, 23: 602-606.

Jung YH, Heo J, Lee YJ, Kwon TK, Kim YH. **Quercetin enhances TRAIL-induced apoptosis in prostate cancer cells via increased protein stability of death receptor 5.** Life Sci 2010, In press.

Kanellou P, Zaravinos A, Zoga M, Spandidos DA. **Deregulation of the tumour suppressor genes p14(ARF), p15(INK4b), p16(INK4a) and p53 in basal cell carcinoma.** Br J Dermatol 2009, 160(6): 1215-21.

Kasaj D, Krenn L, Prinz S, Hufner A, Haslinger E, Yu SS, Kopp B. **Flavon- and flavonolglycosides from Achillea pannonica Scheele.** Z Naturforsch C 2001, 56(7-8): 521-5.

Katiyar SK, Meleth S, Sharma SD. **Silymarin, a flavonoid from milk thistle (Silybum marianum L.), inhibits UV-induced oxidative stress through targeting infiltrating CD11b<sup>+</sup> cells in mouse skin.** Photochem Photobiol 2008, 84(2): 266-71.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. **Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.** Br J Cancer 1972, 26(4): 239-57.

Laciar A, Ruiz ML, Flores RC, Saad JR. **Antibacterial and antioxidant activities of the essential oil of Artemisia echegarayi Hieron (Asteraceae).** Rev Argent Microbiol 2009, 41(4): 226-31.

Lippens S, Hoste E, Vandenabeele P, Agostinis P, Declercq W. **Cell death in the skin.** Apoptosis 2009, 14(4): 549-69.

Mader RM, Müller M and Steger GG. **Resistance to 5-fluorouracil.** Gen Pharmacol 1998, 31(5): 661-6.

Moan J, Porojnicu AC, Dahlback A. **Ultraviolet radiation and malignant melanoma.** Adv Exp Med Biol. 2008;624:104-16. Review.

Moawad A, Hetta M, Zjawiony JK, Jacob MR, Hifnawy M, Marais JP, Ferreira D. **Phytochemical Investigation of Cycas circinalis and Cycas revoluta Leaflets: Moderately Active Antibacterial Biflavonoids.** Planta Med 2010, In press.

Mossmann T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay.** J Immunol Meth 1983: 65: 55-63.

Nguyen T, Gattu S, Pugashetti R, Koo J. **Practice of phototherapy in the treatment of moderate-to-severe psoriasis.** *Curr Probl Dermatol* 2009, 38: 59-78.

Petti S, Scully C. **Polyphenols, oral health and disease: A review.** *J Dent* 2009, 37(6): 413-23.

Poznic M. **Retinoblastoma protein: a central processing unit.** *J Biosci*, 2009 34(2): 305-12.

Proksch E, Brandner JM, Jensen JM. **The skin: an indispensable barrier.** *Exp Dermatol* 2008, 17(12): 1063-72.

Rass K, Reichrath J. **UV damage and DNA repair in malignant melanoma and nonmelanoma skin cancer.** *Adv Exp Med Biol* 2008, 624: 162-78.

Ravanat JL, Douki T, Cadet J. **Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components.** *J Photochem Photobiol B* 2001, 63(1-3): 88-102.

Ribuffo A. **Manuale di Dermatologia e Venereologia.** Lombardo Editore 1980, 1: 1-18.

Rheinwald JG, Green H. **Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells.** *Cell* 1975, 6: 331-344.

Ryu HC, Kim C, Kim JY, Chung JH, Kim JH. **UVB Radiation Induces Apoptosis in Keratinocytes by Activating a Pathway Linked to "BLT2-Reactive Oxygen Species".** *J Invest Dermatol* 2010, In press.

Savini I, D'Angelo I, Ranalli M, Melino G, Avigliano L. **Ascorbic Acid maintenance in HaCaT cells prevents radical formation and apoptosis by UVB.** *Free radical biology & medicine* 1999, 26: 1172-1180.

Scovassi I, Diederich M. **Modulation of poly(ADP-ribosylation) in apoptotic cells.** *Biochemical pharmacology* 2004, 270: 1041-1047.

Singh RP, Agarwal R. **Mechanisms and preclinical efficacy of silibinin in preventing skin cancer.** *European Journal of Cancer* 2005, 41: 1969-1979.

Serobabski Masnec I, Poduje S. **Photoaging.** *Coll Antropol* 2008, 32 (Suppl 2) :177-80.

Srinivasan M, Sudheer AR, Menon VP. **Ferulic Acid: Therapeutic Potential Through Its Antioxidant Property.** J Clin Biochem Nutr. 2007; 40(2): 92–100.

Sinco G, Piccirillo F, Forcione M, Valent F, Patrone P. **An open randomized study to compare narrow band UVB, topical pimecrolimus and topical tacrolimus in the treatment of vitiligo.** Eur J Dermatol 2009, 19(6): 588-93

Talcott ST, Lee JH. **Ellagic acid and flavonoid antioxidant content of muscadine wine and juice.** J Agric Food Chem, 2002, 50(11): 3186-92.

Thornberry NA, Lazebnik Y. **Caspases: enemies within.** Science 1998, 281(5381): 1312-6.

Unno T, Osada C, Motoo Y, Suzuki Y, Kobayashi M, Nozawa A. **Dietary tea catechins increase fecal energy in rats.** J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) 2009, 55(5): 447-51.

Van Laethem A, Garmyn M, Agostinis P. **Starting and propagating apoptotic signals in UVB irradiated keratinocytes.** Photochem Photobiol Sci 2009, 8(3):299-308.

Victor VM, Rocha M, Solá E, Bañuls C, Garcia-Malpartida K, Hernández-Mijares A. **Oxidative stress, endothelial dysfunction and atherosclerosis.** Curr Pharm Des 2009, 15(26): 2988-3002.

Zhang Y, Seeram NP, Lee R, Feng L, Heber D. **Isolation and identification of strawberry phenolics with antioxidant and human cancer cell antiproliferative properties.** J Agric Food Chem 2008, 56(3): 670-5.

Zhu Y, Chen X, Chen Z, Zeng Y, Shi G, Su Y, Peng X. **Curcumin protects mitochondria from oxidative damage and attenuates apoptosis in cortical neurons.** Acta pharmacological clinica 2004, 25: 1606-1612.

Wang J, Lenardo MJ. **Roles of caspase in apoptosis, development, and cytokine maturation revealed by homozygous gene deficiencies.** Journal of cell science 2000, 113: 753-757.

Watt FM. **Involucrin and other markers of keratinocyte terminal differentiation.** J Invest Dermatol 1983, 81(1 Suppl): 100s-3s.

Wozniak D, Janda B, Kapusta I, Oleszek W, Matkowski A. **Antimutagenic and anti-oxidant activities of isoflavonoids from *Belamcanda chinensis* (L) DC.** Mutat Res 2010, In press.

Wu WB, Chiang HS, Fang JY, Chen SK, Huang CC, Hung CF. **(+)-Catechin prevents ultraviolet B-induced human keratinocyte death via inhibition of JNK phosphorylation.** Life Sci 2006, 79(8): 801-7.

Xia M, Wang D, Wang M, Tashiro S, Onodera S, Minami M, Ikejima T. **Dracorhodin Perchlorate induces apoptosis via activation of caspases and generation of reactive oxygen species.** Journal of pharmacological sciences 2004, 95: 273-283.

## Ringraziamenti

E bene sì, anche questo traguardo è stato raggiunto.

Sembra ieri da quando ho iniziato, ma in realtà sono passati già tre anni. Anni di sacrifici, di studio ma anche anni di soddisfazione per gli obiettivi raggiunti, per la crescita professionale e anche per le persone conosciute in questo percorso di Dottorato condiviso insieme.

Un ringraziamento particolare va alla Professoressa Rossi che mi propose l'argomento di questo studio e che mi ha seguita con attenzione durante questi tre anni.

Ringrazio la Professoressa Magnoni e la Dottoressa Benassi per avermi accolta nei Laboratori della Clinica Dermatologica del Policlinico di Modena, per avermi sostenuta, consigliata e soprattutto per tutte le cose che mi hanno insegnato in questi anni di ricerca.

Ringrazio la Professoressa Gaion che in quanto Direttore e coordinatore della Scuola di Dottorato mi ha permesso di vivere questa esperienza.

Ringrazio Daniela Strafella per avermi sopportato in questi tre anni con le mie richieste e domande impossibili.

Ringrazio le ragazze che mi hanno accompagnato in questa avventura: Giorgia, Eugenia e Daria.

Ringrazio la mia famiglia per avermi sostenuto fin dall'inizio in questo percorso di studio. In particolare mio padre che anche se non c'è più spero possa essere fiero di me.

Infine ringrazio Fabio, la persona per me più importante che ha dovuto sopportare tutti i miei momenti sia di felicità che di sconforto.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.  
This page will not be added after purchasing Win2PDF.