

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOTECNOLOGIE, FARMACOLOGIA
E TOSSICOLOGIA - PROGETTO N. 2: FARMACOLOGIA E
TOSSICOLOGIA

XXV CICLO

Settore concorsuale di afferenza: 05/G1
Settore scientifico disciplinare: BIO 14

**STUDIO DEGLI EFFETTI FUNZIONALI E
TOSSICI DI DERIVATI DI BRASSICACEAE IN
MODELLI SPERIMENTALI**

Tesi di Dottorato presentata da:

Dott. Simone Melega

Coordinatore del Dottorato:

Chiar.mo Prof. Giorgio Cantelli Forti

Relatore:

Chiar.mo Prof. Moreno Paolini

Esame finale anno 2013

INDICE

| | |
|---|----|
| INTRODUZIONE | 5 |
| CAPITOLO 1: NUTRACEUTICA E COMPOSTI FITOCHIMICI | 9 |
| CAPITOLO 2: BRASSICACEAE: GLUCOSINOLATI E ISOTIOCIANATI | 13 |
| 2.1 Brassicaceae | 13 |
| 2.2 Glucosinolati | 14 |
| 2.3 Idrolisi dei glucosinolati | 16 |
| 2.4 Isotiocianati | 18 |
| 2.5 Assunzione umana di Brassicaceae e glucosinolati | 19 |
| 2.6 Fattori determinanti la biodisponibilità dei glucosinolati e dei loro metaboliti | 19 |
| 2.7 Assorbimento e distribuzione | 21 |
| 2.8 Metabolismo ed escrezione | 24 |
| CAPITOLO 3: ENZIMI DEL METABOLISMO DEGLI XENOBIOTICI | 26 |
| 3.1 Introduzione | 26 |
| 3.2 Localizzazione degli enzimi del metabolismo degli xenobiotici | 26 |
| 3.3 Le fasi della biotrasformazione | 28 |
| 3.3.1 Reazioni di fase I | 28 |
| 3.3.2 Reazioni di fase II | 29 |
| 3.3.3 Reazioni di fase III | 32 |
| 3.4 Il sistema monoossigenasico citocromo P450-dipendente | 33 |
| 3.5 Meccanismo d'azione del sistema monoossigenasico citocromo P450-dipendente: la reazione monoossigenasica | 36 |
| 3.6 Nomenclatura ed isoforme di citocromo P450 | 38 |
| CAPITOLO 4: MODULAZIONE DEGLI ENZIMI DEL METABOLISMO DEGLI XENOBIOTICI E TEORIA CHEMIOPREVENTIVA | 41 |
| 4.1 Introduzione | 41 |
| 4.2 Modulazione del sistema monoossigenasico citocromo P450- dipendente: induzione ed inibizione..... | 42 |
| 4.2.1 Induzione | 43 |
| 4.2.2 Inibizione | 46 |
| 4.3 Modulazione degli enzimi di fase II: induzione ed inibizione | 47 |
| 4.3.1 Induzione | 48 |
| 4.3.2 Inibizione | 49 |

| | |
|--|----|
| CAPITOLO 5: | |
| IL RUOLO DEL METABOLISMO NELLA CANCEROGENESI E NELLA CHEMIOPREVENZIONE | 50 |
| | |
| CAPITOLO 6: | |
| STRESS OSSIDATIVO ED AGENTI ANTIOSSIDANTI | 54 |
| 6.1 Introduzione | 54 |
| 6.2 Formazione dei radicali | 54 |
| 6.3 Effetti dei radicali | 56 |
| 6.4 Controllo dello stato ossidoreduztivo cellulare | 59 |
| 6.5 Sistemi antiossidanti | 59 |
| 6.6 Antiossidanti ad azione indiretta | 63 |
| 6.7 Stress ossidativo e patologie correlate | 64 |
| | |
| CAPITOLO 7: | |
| ATTIVITÀ BIOLOGICA DELLE BRASSICACEAE: EFFETTI BENEFICI E TOSSICI | 67 |
| 7.1 Introduzione | 67 |
| 7.2 Attività chemiopreventiva | 68 |
| 7.3 Prevenzione di malattie cardiovascolari | 70 |
| 7.4 Protezione del sistema nervoso centrale | 71 |
| 7.5 Ulteriori effetti protettivi | 72 |
| 7.6 Effetti tossici | 73 |
| | |
| CAPITOLO 8: | |
| SCOPO DELLA TESI | 77 |
| | |
| CAPITOLO 9: | |
| MATERIALI E METODI | 81 |
| 9.1 Preparazione dell'estratto | 81 |
| 9.2 Incubazione dell'estratto con mirosinasi ed analisi chimiche | 82 |
| 9.3 Disegno sperimentale | 83 |
| 9.4 Monitoraggio del peso corporeo e del consumo di cibo | 85 |
| 9.5 Sacrificio e preparazione delle frazioni subcellulari | 86 |
| 9.6 Determinazione della concentrazione delle proteine con il metodo di Lowry | 87 |
| 9.7 Determinazione del citocromo P450 | 88 |
| 9.8 Studio delle attività enzimatiche | 89 |
| 9.8.1 Saggi per la determinazione dell'attività specifica degli enzimi di fase I | 89 |
| 9.8.1.1 NADPH-citocromo (P450)-c-reduttasi | 89 |
| 9.8.1.2 Amminopirina N-demetilasi | 90 |
| 9.8.1.3 p-Nitrofenolo idrossilasi | 90 |
| 9.8.1.4 Pentossiresorufina O-dealchilasi, metossiresorufina O- demetilasi, etossiresorufina O-deetilasi | 91 |

| | |
|--|-----|
| 9.8.1.5 7-Etossicumarina O-deetilasi | 92 |
| 9.8.2 Saggi per la determinazione dell'attività specifica degli enzimi di fase II | 93 |
| 9.8.2.1 UDP-glucuroniltransferasi | 93 |
| 9.8.2.2 Glutazione S-transferasi | 94 |
| 9.8.3 Saggi per la determinazione dell'attività specifica degli enzimi antiossidanti | 95 |
| 9.8.3.1 Catalasi | 95 |
| 9.8.3.2 NAD(P)H:chinone reduttasi | 95 |
| 9.8.3.3 Glutazione reduttasi | 95 |
| 9.8.3.4 Glutazione perossidasi | 96 |
| 9.8.3.5 Superossido dismutasi | 96 |
| 9.9 Analisi ematochimiche | 96 |
| 9.10 Espressione dei risultati ed analisi statistica | 97 |
| 9.11 Perfusione epatica ed isolamento di epatociti primari | 97 |
| 9.12 Coltura di epatociti primari | 99 |
| 9.13 Esposizione di epatociti primari | 99 |
| 9.14 Studio della citotossicità | 100 |
| 9.15 Saggio dei TBARs | 101 |
| 9.16 Estrazione dell'RNA totale | 102 |
| 9.17 Valutazione quantitativa e qualitativa dell'RNA | 103 |
| 9.18 Studio dell'espressione genica | 103 |
| 9.19 Espressione dei risultati ed analisi statistica | 106 |
| 9.19.1 Analisi delle componenti principali | 106 |
| 9.19.2 <i>Heatmap</i> | 107 |
| 9.19.3 Analisi dell'ontologia genica | 107 |
| 9.19.4 Diagrammi di Venn | 108 |

CAPITOLO 10:

| | |
|--|-----|
| RISULTATI | 109 |
| 10.1 Prima fase dello studio | 109 |
| 10.1.1 Contenuto di glucosinolati nell'estratto di germogli di cavolo nero toscano | 109 |
| 10.1.2 Determinazione degli isotiocianati nell'estratto di germogli di cavolo nero toscano dopo incubazione con mirosinasi | 110 |
| 10.1.3 Effetti della somministrazione dell'estratto di germogli di cavolo nero toscano sul peso corporeo ed epatico | 110 |
| 10.1.4 Effetti dell'estratto di germogli di cavolo nero toscano sul sistema monoossigenasico P450-dipendente | 110 |
| 10.1.5 Effetti dell'estratto di germogli di cavolo nero toscano sugli enzimi di fase II | 111 |
| 10.1.6 Effetti dell'estratto di germogli di cavolo nero toscano sugli enzimi antiossidanti | 112 |
| 10.1.7 Effetti dell'estratto di germogli di cavolo nero toscano sui principali parametri ematochimici | 113 |
| 10.2 Seconda fase dello studio | 113 |
| 10.2.1 Contenuto di glucosinolati nell'estratto di germogli di cavolo nero toscano | 113 |

| | | |
|---------------------|---|-----|
| 10.2.2 | Determinazione degli isotiocianati nell'estratto di germogli di cavolo nero toscano dopo incubazione con mirosinasi | 114 |
| 10.2.3 | Peso corporeo, peso del fegato e consumo di cibo | 114 |
| 10.2.4 | Profilo lipidico sierico | 115 |
| 10.2.5 | Effetti dell'estratto di germogli di cavolo nero toscano sugli enzimi antiossidanti | 115 |
| 10.2.6 | Effetti dell'estratto di germogli di cavolo nero toscano sugli enzimi di fase II | 116 |
| 10.3 | Parte sperimentale svolta all'estero | 116 |
| 10.3.1 | Citotossicità | 116 |
| 10.3.2 | Saggio dei TBARs | 117 |
| 10.3.3 | Studio dell'espressione genica | 118 |
| 10.3.3.1 | Analisi delle componenti principali | 118 |
| 10.3.3.2 | <i>Heatmap</i> | 119 |
| 10.3.3.3 | Analisi dell'ontologia genica | 119 |
| 10.3.3.4 | Principali geni modulati | 122 |
| 10.3.3.5 | Diagrammi di Venn | 122 |
| CAPITOLO 11: | | |
| | DISCUSSIONE E CONCLUSIONI | 173 |
| | BIBLIOGRAFIA | 187 |

INTRODUZIONE

E' opinione diffusa ormai, che le principali strategie di difesa contro molte patologie, consistano principalmente nell'evitare fattori di rischio e nell'adottare un corretto stile di vita. Certamente sono sempre più numerose le evidenze scientifiche a sostegno dell'ipotesi che alcuni alimenti, o componenti alimentari, abbiano effetti benefici sulla salute.

Se da un lato, la dieta rappresenta uno dei maggiori fattori di rischio per numerose condizioni patologiche come tumori, malattie cardiovascolari e neurodegenerative, dall'altro, un'alimentazione equilibrata e ricca di frutta e verdura viene associata ad una loro riduzione in diversi studi scientifici (Slavin *et al.* 2012). Queste osservazioni hanno determinato lo sviluppo di numerosi programmi di salute pubblica in cui si raccomanda per esempio il consumo giornaliero di cinque/nove porzioni di frutta e verdura di ogni colore, ed hanno indirizzato il mondo scientifico a compiere studi volti all'identificazione dei costituenti alimentari della matrice vegetale ai quali si attribuisce la presunta attività benefica per la salute. Negli ultimi anni l'obiettivo della ricerca nutrizionale, si è orientato proprio verso l'identificazione di componenti biologicamente attivi degli alimenti, e in molti prodotti tradizionali, tra cui frutta e verdura, sono stati identificati costituenti con potenziali effetti salutari.

Fra questi, oltre a macronutrienti come fibre, grassi, carboidrati e proteine, e micronutrienti come vitamine e minerali, molta attenzione è stata dedicata soprattutto ai composti fitochimici (*phytochemicals*), non-nutrienti della matrice vegetale, dotati di numerose attività biologiche (Traka *et al.* 2011). Molte risorse sono state quindi investite per approfondire la conoscenza dei meccanismi biologici alla base degli effetti protettivi sulla salute da parte dei prodotti vegetali e dei *phytochemicals* in essi contenuti. Tra le principali proprietà identificate si trovano per esempio la capacità di modulare l'attività degli enzimi del metabolismo degli xenobiotici e gli effetti antiossidanti, che assumono particolare rilievo soprattutto nell'ambito chemiopreventivo. La modulazione del sistema metabolico viene, infatti,

considerata una promettente strategia contro il cancro, in accordo con la teoria chemiopreventiva classica (Talalay 1989). Secondo tale teoria il danno genetico, provocato dal processo di cancerogenesi chimica, potrebbe essere evitato con l'inattivazione degli enzimi di fase I (principalmente rappresentati dal sistema monoossigenasico citocromo P450-dipendente), definiti bioattivanti, poiché sono in grado di promuovere l'attivazione di procancerogeni, promutageni e protossici, nella loro forma attiva terminale, e anche attraverso l'induzione degli enzimi di fase II, definiti detossificanti per la loro capacità di biotrasformare gli intermedi elettrofili generati, e di coniugarli con molecole endogene polari, rendendo in questo modo più veloce la loro eliminazione dall'organismo. Oltre al coinvolgimento degli enzimi del metabolismo di fase I e II nel processo di cancerogenesi, anche lo stress ossidativo gioca un ruolo determinante nella patogenesi dei tumori, e di molte altre condizioni patologiche come l'infiammazione, disturbi cardiovascolari, disfunzioni metaboliche ed endocrine, che sono generalmente accompagnate da una condizione di sovrappeso conseguente ad un'alimentazione ricca in grassi e povera di alimenti vegetali. Una condizione di iperlipidemia, che deriva comunemente da uno stile di vita scorretto, è stata inoltre associata ad un aumento dello stress ossidativo, e ad una diminuzione delle capacità antiossidanti e detossificanti dell'organismo, risultante in un'inefficace eliminazione di molecole tossiche e radicaliche, ed un conseguente rischio di danneggiamento delle componenti subcellulari (Yazdanparast *et al.* 2008, Bhandari *et al.* 2011).

L'abilità di alcune sostanze naturali di migliorare e prevenire queste condizioni, ha incrementato l'interesse nella ricerca di agenti ipolipemizzanti e antiossidanti contenuti in frutta e verdura. L'effetto protettivo delle molecole antiossidanti, si eserciterebbe principalmente agendo da *scavenger* direttamente sui radicali liberi, o stimolando indirettamente l'aumento delle difese antiossidanti enzimatiche. L'importanza di queste osservazioni, in termini di strategie alimentari preventive sulla salute, ha spinto recentemente molte aziende del settore farmaceutico a collaborare con le maggiori multinazionali alimentari, per la

ricerca e lo sviluppo di alimenti, e di loro derivati, con proprietà nutraceutiche. Tuttavia, la scoperta delle qualità benefiche di alcuni alimenti, soprattutto quelli vegetali, è stata spesso tradotta, in modo non poco riduttivo, nell'adozione di un regime alimentare "monodietetico", che prevede il consumo di una singola varietà di frutta e verdura in grandi quantità, o, addirittura, nell'introduzione nella dieta di integratori alimentari, contenenti singole classi di *phytochemicals*, a dosi molto elevate. Il razionale di tali approcci sarebbe basato sull'analogia tra effetto benefico di frutta e verdura (probabilmente dovuto a decine di migliaia di molecole nel loro contesto naturale), ed effetto benefico di una singola varietà o composto fitochimico. Tuttavia, vengono trascurate in questo modo le osservazioni che, i benefici di frutta e verdura, in alcune situazioni, come nel passaggio da un'alimentazione varia ad una più selezionata, tendano a modificarsi, determinando considerevoli effetti avversi. In tal senso esempi emblematici sono rappresentati dal consumo selettivo di singole varietà di Brassicaceae (broccoli, cavoli o cavoletti di Bruxelles) in grado di indurre specifiche isoforme di citocromo P450, o di particolari vitamine (es. vitamine E), e provitamine (es. beta-carotene) (Sapone *et al.* 2012). In queste ultime circostanze è stato dimostrato che la supplementazione della dieta con tali molecole aumenterebbe il rischio tossicologico piuttosto che apportare benefici alla salute. Gli enzimi ossidativi, infatti, come quelli di fase I, possono potenzialmente aumentare il rischio di insorgenza di cancro, tramite per esempio un aumento dell'attivazione di molecole mutagene e cancerogene, con cui si viene comunemente a contatto. Le stesse molecole, che nel contesto di altre migliaia di molecole presenti in un vegetale intero, presentano effetti benefici, singolarmente e ad alti dosaggi, possono assumere caratteristiche citotossiche, mutagene, e proossidanti, con risultati imprevedibili e rischiosi per la salute (Paolini *et al.* 2003). Sembra, infatti, difficile immaginare che un singolo *phytochemical*, selezionato come rappresentativo o surrogato di un vegetale, come per esempio il licopene per il pomodoro, il sulforafane per i broccoli, o il beta-carotene per la carota, usato come supplemento alimentare possa offrire un vantaggio, in quanto è

la varietà di molecole presenti in frutta e verdura che sembrano necessarie per conferire protezione verso le malattie. Non è senza significato il fatto che molti studi clinici, che hanno impiegato singole molecole naturali, hanno fallito nel riprodurre gli effetti benefici del vegetale intero di origine, osservando invece effetti negativi sulla salute (Sapone *et al.* 2012).

Alla luce di queste considerazioni, in questo lavoro, particolare attenzione è stata dedicata ai vegetali appartenenti alla famiglia delle Brassicaceae: in particolare, inizialmente è stata studiata, in termini chemiopreventivi, la modulazione degli enzimi antiossidanti e degli enzimi del metabolismo degli xenobiotici, nel modello animale, da parte di un estratto di germogli di cavolo nero toscano, altamente rappresentativo del vegetale di origine. Successivamente è stato investigato, il ruolo protettivo del medesimo estratto, nei confronti delle alterazioni provocate da un'alimentazione iperlipidica, focalizzando l'attenzione soprattutto sui possibili effetti antiossidanti ed ipolipidemizzanti.

Nella parte del lavoro, svolta presso un istituto di ricerca estero, *The Leibniz Research Centre for Working Environment and Human Factors (IfADo)* di Dortmund in Germania, l'attenzione è stata invece rivolta allo studio, *in vitro*, dei potenziali effetti tossici di singole molecole derivate da Brassicaceae, attraverso lo studio della citotossicità e dell'alterazione dell'espressione multigenica tramite l'utilizzo di *microarrays*.

CAPITOLO 1

NUTRACEUTICA E COMPOSTI FITOCHIMICI

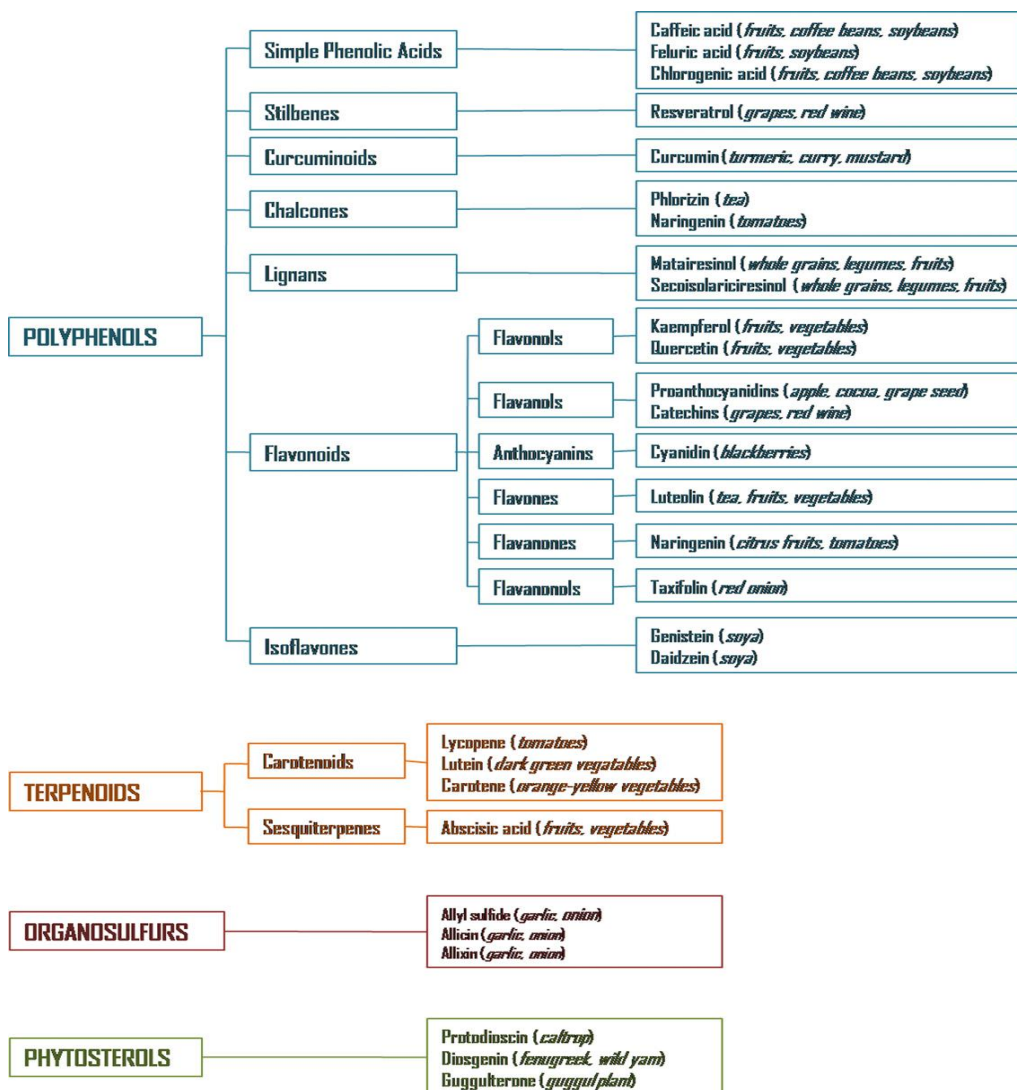
Gli alimenti nutraceutici, comunemente definiti funzionali, sono alimenti o parti di essi, dotati, indipendentemente dal loro valore nutrizionale, di proprietà benefiche sulla salute, in grado di migliorare una specifica funzione fisiologica o di ridurre il rischio di malattia. In realtà, il termine "nutraceutico" si riferirebbe al singolo composto con proprietà benefiche, mentre il termine "alimento funzionale" alluderebbe piuttosto agli effetti dell'intero alimento (Arai *et al.* 2008).

Il moderno mercato dei prodotti nutraceutici si è sviluppato in Giappone durante gli anni '80, mentre il concetto di alimento, come medicina per prevenire e curare le malattie, ha origine nelle antiche civiltà egiziane, cinesi ed indiane (Robert *et al.* 2001). I nutraceutici possono essere rappresentati da un alimento intero contenente molecole dotate di attività biologica, da alimenti arricchiti di molecole "salutari", oppure essere assunti sotto forma di integratori alimentari in diverse formulazioni. Negli ultimi anni molta attenzione è stata dedicata soprattutto ai composti fitochimici (*phytochemicals*), non-nutrienti della matrice vegetale dotati di numerose proprietà. I composti fitochimici o *phytochemicals* sono sostanze, non nutrienti, che si trovano nella matrice degli alimenti di origine vegetale, come frutta e verdura, dotati di attività biologica (Müller *et al.* 2003). I *phytochemicals* sono un insieme estremamente disomogeneo di composti, con alcune caratteristiche comuni: sono sostanze organiche generalmente a basso peso molecolare, sono responsabili del colore e delle caratteristiche organolettiche del vegetale, hanno azione perlopiù protettiva sulla salute umana, dovuta per esempio all'attività antiossidante, alla capacità di influenzare il metabolismo, il sistema immunitario ed il sistema ormonale (Christen *et al.* 2012).

I *phytochemicals* possono essere suddivisi in quattro gruppi principali (Figura 1.1):

- 1) polifenoli;
- 2) terpenoidi;
- 3) fitosteroli;
- 4) organosolfuri.

Figura 1.1. Classificazione dei *phytochemicals*.



1) Polifenoli

I polifenoli, grazie alla struttura ad anelli fenolici, possono svolgere direttamente attività di *scavenger* di radicali liberi, di agenti riducenti, di chelanti di metalli proossidanti e di *quencher* della formazione di radicali dell'ossigeno. Numerosi studi preclinici hanno rivelato che queste molecole presentano importanti attività protettive nei confronti di molte condizioni patologiche, in particolare quelle in cui è coinvolta una componente di stress ossidativo. Come mostrato in Figura 1.1, i polifenoli vengono raggruppati in diverse classi (Scalbert *et al.* 2000):

- acidi fenolici semplici: es. acido ferulico, caffeico, para-cumarico, vanillico, gallico, ellagico;
- stilbeni: es. resveratrolo;
- curcuminoidi: es. curcumino;
- calconi: es. florizina;
- lignani: es. matairesinolo e secoisolariciresinolo;
- flavonoidi: es. quercetina, catechina, epicatechina; antocianine, flavoni e isoflavoni.

2) Terpenoidi (isoprenoidi)

Costituiscono una delle più grandi famiglie di prodotti naturali, si contano oltre 40.000 composti. Essi possono essere descritti come terpeni chimicamente modificati. La loro più importante caratteristica strutturale è la lunga serie di doppi legami coniugati nella parte centrale della molecola, vulnerabile ad ossidazione e cis-trans isomerizzazione. Tra questi, i carotenoidi sono classificati in idrocarburi (caroteni) e loro derivati ossigenati (xantofille). Sono responsabili del colore giallo, arancione e rosso di molti frutti e verdure. I caroteni come l' α -carotene, il β -carotene e il licopene rappresentano i precursori per la biosintesi della vitamina A, e

svolgono ruoli importanti nella risposta immunitaria, nella differenziazione cellulare, e come agenti ad attività antiossidante (Christen *et al.* 2012).

3) Fitosteroli

I fitosteroli sono composti naturali strutturalmente simili al colesterolo. Le migliori fonti alimentari di fitosteroli sono gli oli vegetali non raffinati, semi, cereali, noci e legumi. I fitosteroli hanno effetti potenziali contro l'obesità, l'aterosclerosi e dotati di proprietà ipolipidemizzanti.

I fitosteroli competono con il colesterolo per la formazione di micelle nel lume intestinale e ne inibiscono l'assorbimento, e sono in grado di modulare fattori di trascrizione che controllano geni coinvolti nel metabolismo lipidico (Rocha *et al.* 2011).

4) Organosolfuri

Sono particolarmente abbondanti nei vegetali del genere *Allium* (es. aglio e cipolla) che contengono sostanze bioattive come allicina, allixina e solfuri allilici. A queste molecole si devono il sapore e l'aroma, nonché i molti dei presunti effetti terapeutici associati a questi vegetali, tra cui il potenziale chemiopreventivo, anti-trombotico, ipoglicemizzanti e ipolipemizzanti, osservati in diversi studi. Tra i composti solforati vi sono i glucosinolati (GLS), composti di cui sono ricchi i vegetali appartenenti alla famiglia delle Brassicaceae, che verranno descritti esaustivamente nel seguente capitolo (Vasanthi *et al.* 2009).

CAPITOLO 2

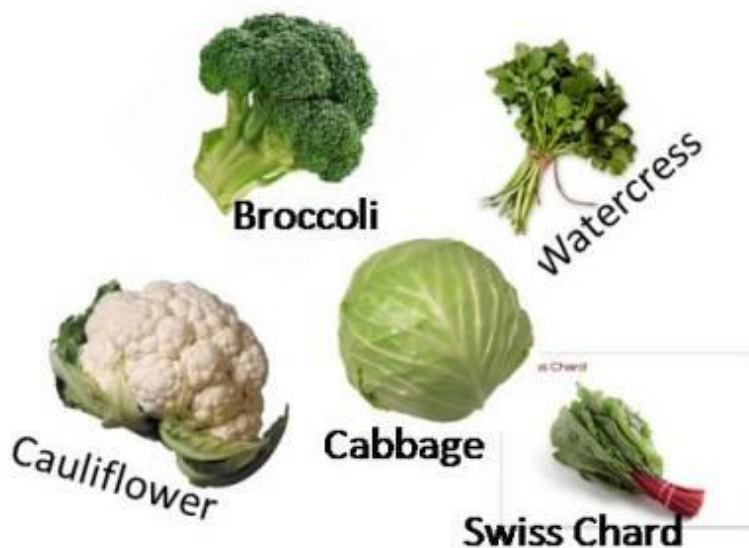
BRASSICACEAE: GLUCOSINOLATI E ISOTIOCIANATI

2.1 BRASSICACEAE

Le Brassicaceae sono una famiglia di piante erbacee tipiche delle regioni extratropicali dell'emisfero boreale. Comprendono circa 300 generi e quasi 4000 specie, e molte di esse vengono coltivate e utilizzate a scopo alimentare, sia umano che animale.

I generi più importanti per l'alimentazione umana sono: *Brassica oleracea*, che costituisce un gruppo da cui derivano molti *cultivars* (cavolo nero, cavolo cappuccio, cavolfiore, cavoletti di Bruxelles, broccoli, cavolo rapa), *Sinapis alba* (senape bianca), *Raphanus sativus* (ravanello), *Eruca sativa* (rucola) (Figura 2.1).

Figura 2.1. Principali vegetali appartenenti alla famiglia delle Brassicaceae.



Le Brassicaceae, rispetto ad altri vegetali, sono dotate di una significativa attività biologica, responsabile da una parte, di numerosi effetti benefici per la salute largamente riportati in letteratura, ma dall'altra, anche di fenomeni

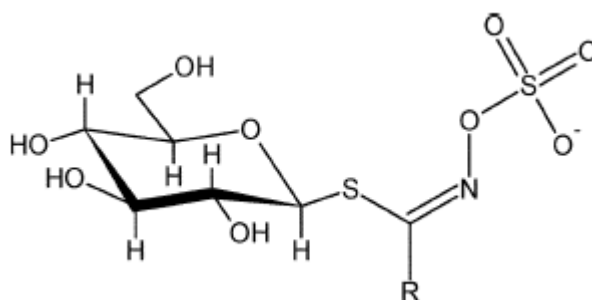
di tossicità. Queste proprietà vengono ascritte principalmente all'elevato contenuto di GLS, caratteristico di questi vegetali.

I GLS sono un gruppo di sostanze fitochimiche che comprende una miscela di più di 300 differenti composti largamente distribuiti nella famiglia delle Brassicaceae, responsabili del loro distintivo odore e gusto pungente (Björkman *et al.* 2011).

2.2 GLUCOSINOLATI

Da un punto di vista chimico i GLS sono costituiti da β -D-tioglucosio, una parte glucidica unita tramite legame tioglucosidico ad un'ossima sulfonata, ed una catena laterale (R) variabile di natura amminoacidica (Figura 2.2). Quest'ultima, può presentare gruppi alifatici, aromatici, o eterocicli (indolo), e proprio queste diverse caratteristiche strutturali, determinano le proprietà chimico-fisiche e biologiche dei GLS e dei loro derivati (Valgimigli *et al.* 2009).

Figura 2.2. Struttura chimica dei glucosinolati.



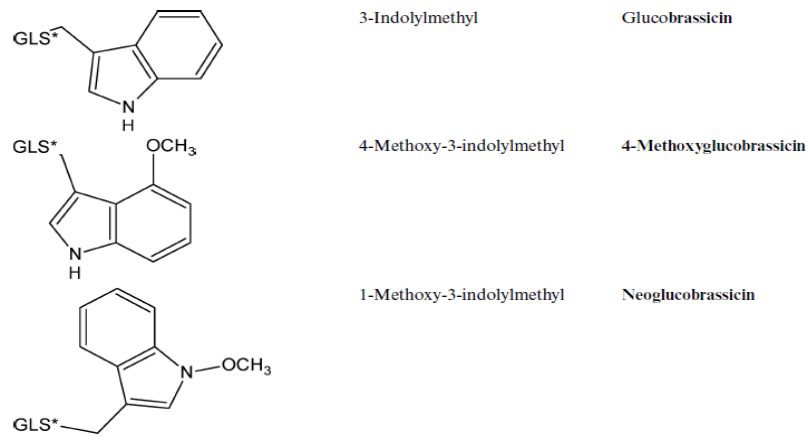
La presenza del gruppo solfato conferisce alla molecola intatta caratteristiche fortemente acide, e così, i glucosinolati in natura si trovano sotto forma di anioni, controbilanciati da un catione come il potassio. I GLS sono infatti sequestrati sottoforma di sali di potassio nei vacuoli delle cellule vegetali. I GLS sono generalmente presenti in tutte le parti della pianta, ma con differenze sia qualitative che quantitative. Per esempio, nei semi e nei germogli la quantità totale può essere fino a dieci volte superiore a quella

rilevata negli altri tessuti, costituendo anche il 10% del totale (Holst *et al.* 2004).

Trai i principali GLS, sono da ricordare la glucorafanina (GRA) glucoiberina (GIB), la glucoerucina (GER), la 4-OH-glucoerucina (4OH-GBS), glucoerucina (GBS), 4-methoxy-glucoerucina (4OM-GBS), neo-glucoerucina (NEOGBS), sinigrina e progoitrina, che per esempio nei semi di broccolo o nei germogli, formano complessivamente il 40-50 % dei GLS totali (Figura 2.3).

Figura 2.3. Struttura dei principali glucosinolati presenti nelle Brassicaceae.

| Structure | R-group name | Trivial name |
|---|------------------------------|------------------|
| GLS*—CH ₃ | Methyl | Glucocapparin |
| GLS*—(CH ₂) ₃ —S—CH ₃ | 3-(Methylthio)propyl | Glucoibervirin |
| GLS*—(CH ₂) ₄ —S—CH ₃ | 4-(Methylthio)butyl | Glucoerucin |
| GLS*—(CH ₂) ₃ —S(=O)—CH ₃ | 3-(Methylsulfinyl)propyl | Glucoiberin |
| GLS*—(CH ₂) ₄ —S(=O)—CH ₃ | 4-(Methylsulfinyl)butyl | Glucoraphanin |
| GLS*—(CH ₂) ₃ —S(=O) ₂ —CH ₃ | 3-(Methylsulfonyl)propyl | Glucocheirolin |
| GLS*—(CH ₂) ₄ —S(=O) ₂ —CH ₃ | 4-(Methylsulfonyl)butyl | Glucoerysolin |
| GLS*—(CH ₂) ₂ —CH=CH ₂ | Allyl (2-propenyl) | Sinigrin |
| GLS*—(CH ₂) ₃ —CH=CH ₂ | 3-Butenyl | Gluconapin |
| GLS*—(CH ₂) ₂ —CH(OH)—CH=CH ₂ | 2-Hydroxy-3-butenyl (R) | Progoitrin |
| GLS*—(CH ₂) ₄ —CH=CH ₂ | 4-Pentenyl | Glucobrassicinap |
| GLS*—(CH ₂) ₃ —CH=CH—S(=O)—CH ₃ | 4-(Methylsulfinyl)-3-butenyl | Glucoraphenin |
| GLS*—CH ₂ —C ₆ H ₅ | Benzyl | Gluco tropeolin |
| GLS*—CH ₂ —C ₆ H ₄ (OH) | 2-Hydroxybenzyl | |
| GLS*—CH ₂ —CH ₂ —C ₆ H ₅ | 2-Phenylethyl | Gluconasturtiin |



2.3 IDROLISI DEI GLUCOSINOLATI

L'enzima mirosinasi (MYR) (EC 3.2.3.1) è una β -tioglucosidasi presente nelle cellule di questi vegetali, che viene mantenuto fisicamente separato dai GLS. Quando il tessuto vegetale viene danneggiato, come per esempio in seguito a masticazione o processazione, questo enzima può entrare in contatto con i GLS. La MYR è in grado di catalizzare l'idrolisi del legame β -tioglucosidico, liberando l'aglicone e il D-glucosio. Il risultante aglicone instabile, tioidrossiammato-o-sulfonato, va incontro ad un riarrangiamento spontaneo non enzimatico (riarrangiamento di Lossen) (Figura 2.4) che genera un'ampia varietà di prodotti, la cui struttura chimica dipende dalle condizioni di reazione (temperatura, pH, presenza di ioni Fe^{2+} , e cofattori proteici) e dalla struttura del GLS di origine (Bones *et al.* 2006). Tra i principali prodotti di degradazione dei GLS sono da ricordare gli isotiocianati (ITC) (R-N=C=S), i tiocianati (R-S-C=N), e i nitrili (R-C=N) (Figura 2.5). Bassi valori di pH, come quello dello stomaco, possono per esempio favorire la formazione di nitrili, piuttosto che di ITC. In aggiunta all'enzima presente nelle piante, la MYR è presente nei batteri della microflora intestinale animale e umana. Ciò risulta molto importante in quanto, con la cottura dei cibi, la MYR presente nei tessuti vegetali viene inattivata, e i GLS ingeriti intatti vengono convertiti nei loro metaboliti da questo enzima intestinale, seppur con un'efficienza minore (circa del 20-30 %) rispetto alla MYR vegetale, che è in grado, nelle condizioni ottimali di

effettuare un'idrolisi completa di tutti i GLS con cui viene a contatto (Fahey *et al.* 2012).

Figura 2.4. Riarrangiamento di Lossen.

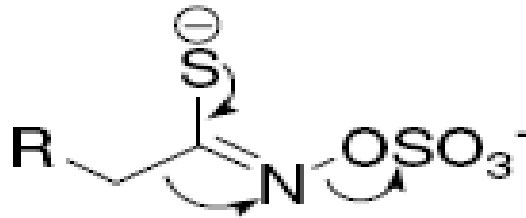
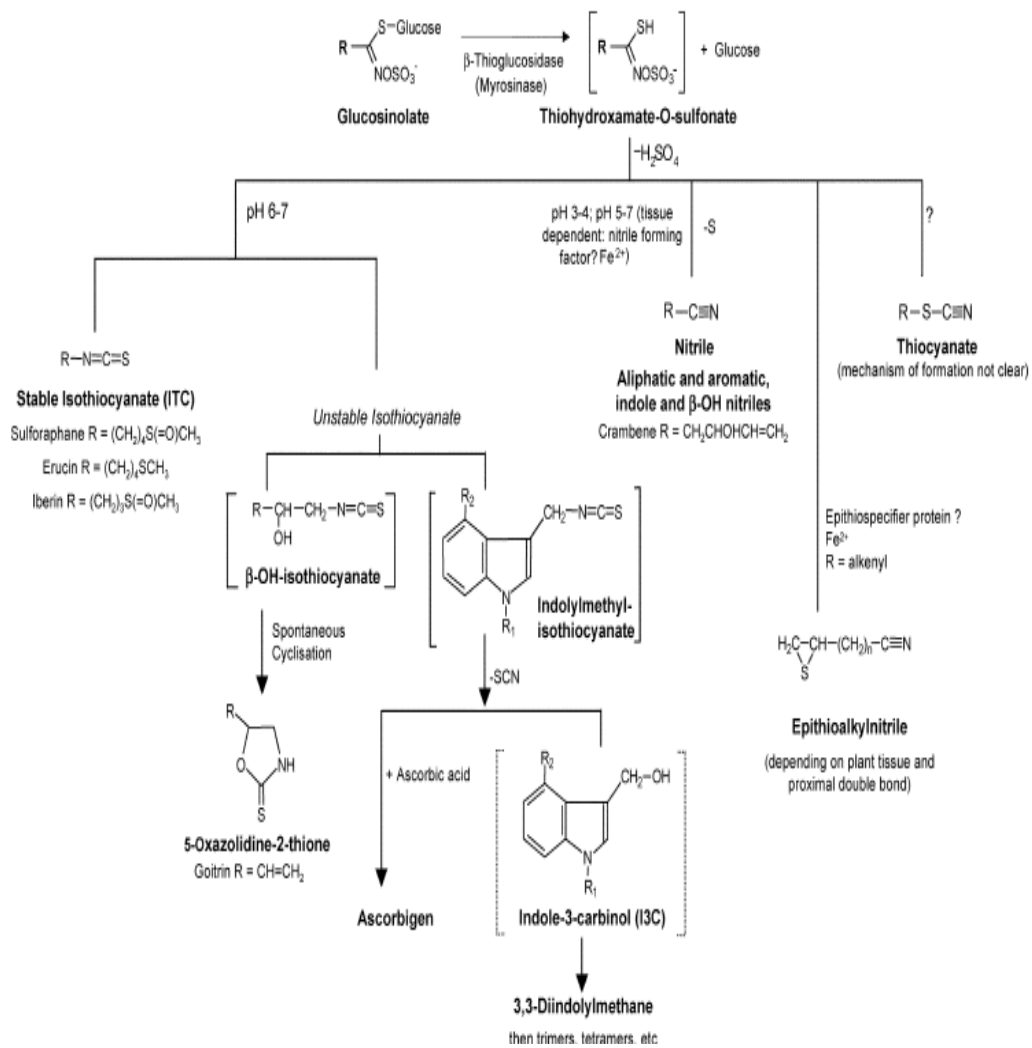


Figura 2.5. Principali prodotti derivanti dai glucosinolati in seguito ad idrolisi mediata dall'enzima mirosinasi.

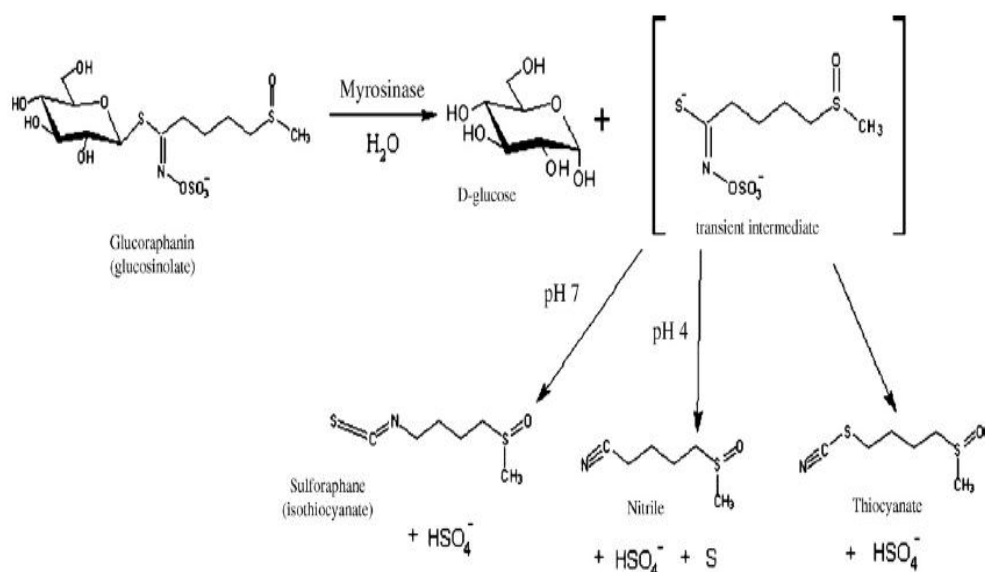


2.4 ISOTIOCIANATI

Tra i prodotti più importanti, derivanti dalla degradazione enzimatica dei GLS, si trovano gli ITC. Il sulforafane (SFN), il feniletil isotiocianato (PEITC), l'indolo-3-carbinolo (I3C), il 3,3'-diindolimetano (DIM) e il benzil-isotiocianato (BITC), sono gli ITC tra i più studiati fin'ora, e dotati di maggior attività biologica.

Il SFN è sicuramente l'ITC che ha attirato maggiormente l'attenzione del mondo scientifico per le sue proprietà terapeutiche. Il SFN deriva da uno dei GLS più abbondanti nelle Brassicaceae, la GRA, in seguito alla reazione di idrolisi mediata da MYR a pH 7 (Figura 2.6).

Figura 2.6. Idrolisi della glucorafanina da parte dell'enzima mirosinasi.



Gli ITC sono molecole altamente bioattive, rispetto ad altri *phytochemicals*, caratterizzate dalla presenza di un gruppo $-N=C=S$, in cui l'atomo di carbonio centrale, fortemente elettrofilo, è in grado di reagire con i gruppi nucleofili dei bersagli cellulari.

Il citocromo P450 può catalizzare la desulfurazione ossidativa del gruppo $-N=C=S$ degli ITC a isocianati $-N=C=O$. Poiché gli isocianati sono composti

elettrofili, in maniera analoga agli ITC, potrebbero essere coinvolti nelle stesse reazioni con i nucleofili intracellulari.

Tuttavia, sia per gli ITC che per gli isocianati la reazione con i gruppi –SH delle molecole cellulari sembra costituire la principale via biochimica responsabile dell'attività biologica (Fimognari *et al.* 2012).

2.5 ASSUNZIONE UMANA DI BRASSICACEAE E GLUCOSINOLATI

Il consumo medio di vegetali appartenenti alla famiglia delle Brassicaceae varia notevolmente nelle diverse aree del mondo. Tra i paesi in cui questi vegetali vengono consumati maggiormente si trova la Cina, l'Australia, il Regno Unito e gli Stati Uniti. Contrariamente nel sud Africa e nel sud America il loro consumo risulta essere significativamente inferiore (IARC, 2004). I dati sul consumo di GLS *pro capite* sono alquanto limitati e difficili da determinare, soprattutto per mancanza di conoscenza sul contenuto di GLS nei singoli vegetali, per la variabilità del loro contenuto nei diversi vegetali e tra diverse aree geografiche. Inoltre, le modalità con cui i vegetali vengono processati (es. lavorazione, conservazione, e cottura) influenzano notevolmente il contenuto finale di GLS. Un altro fattore da tenere in considerazione sono le preferenze culturali e personali, che possono avere un impatto sull'effettiva assunzione di GLS.

Recentemente è stato compilato un *database* sul contenuto dei GLS in diversi vegetali appartenenti alla famiglia delle Brassicaceae, e sulla base di questo, è stata calcolata una stima dell'assunzione media giornaliera nella popolazione tedesca pari a 14.5 mg *pro capite* (Steinbrecher *et al.* 2009).

2.6 FATTORI DETERMINANTI LA BIODISPONIBILITÀ DEI GLUCOSINOLATI E DEI LORO METABOLITI

Risulta plausibile che i GLS ingeriti, vengano assorbiti e metabolizzati quasi completamente in quanto solo una piccola parte di GLS intatti è stata

riscontrata nelle feci e nelle urine, in diversi studi. È stato riportato inoltre, che solo il 60 % circa, dei GLS intatti ingeriti raggiunge il colon senza essere modificato. I fattori che sembrano essere maggiormente responsabili di questa “perdita” durante le prime fasi della digestione sono: acidità gastrica; legami non-specifici con macromolecole come proteine, peptidi e piccole glicoproteine; idrolisi da parte della MYR vegetale ed intestinale (Shapiro *et al.* 1998 e 2001). In aggiunta, la biodisponibilità dei GLS e dei loro derivati varia ampiamente tra il consumo di vegetali freschi, e vegetali che hanno subito processi tecnologici o di immagazzinamento (Volden *et al.* 2008). Per esempio, in seguito al congelamento, può essere perso anche il 50 % del contenuto di GLS originari, mentre il taglio del vegetale favorisce l'idrolisi sulla superficie sezionata. Alte temperature provocano inattivazione della MYR vegetale, e in questo caso, la conversione ad ITC avviene solo parzialmente da parte dell'enzima intestinale.

Diversi studi hanno riportato che l'idrolisi dei GLS e l'assorbimento di ITC, sono più efficaci in seguito al consumo di vegetali crudi, rispetto a quelli cotti, in cui l'enzima MYR è stato completamente o parzialmente inattivato, a seconda della modalità di cottura (Rungapamestry *et al.* 2007).

La variabilità interindividuale, dovuta alle differenze genotipiche, all'eterogeneità della microflora intestinale, e all'efficacia della masticazione sulla rottura dei tessuti, possono influenzare ulteriormente l'esposizione finale agli ITC (Fahey *et al.* 2012).

In uno studio sulla biodisponibilità degli ITC, effettuato somministrando un estratto di germogli di broccoli, contenente solo ITC o solo GLS (in cui la MYR era stata completamente inattivata), l'escrezione urinaria cumulativa di ITC equivalenti (ITC e loro metaboliti), nelle 72 h, risultava pari all'80 % nel primo caso e al 12 % nel secondo (Shapiro *et al.* 2001). In un altro studio, progettato per confrontare la biodisponibilità degli ITC in seguito al consumo di broccoli crudi e cotti al vapore, in cui il contenuto di ITC era inizialmente il medesimo, l'escrezione urinaria di ITC nelle 24 h risultava essere del 32.3 % per i broccoli crudi e del 10.25 % per quelli cotti, indicando così che la biodisponibilità degli ITC in seguito al consumo di

vegetali crudi, dove la MYR non era stata inattivata dalla cottura, era tre volte superiore (Conaway *et al.* 2000).

Da questi esempi si evince facilmente che il consumo di vegetali contenenti MYR attiva porta ad un'esposizione finale di ITC molto più grande rispetto a quelli in cui l'enzima è inattivo.

Bisogna considerare inoltre, che l'idrolisi dei GLS a ITC può avvenire anche da parte della MYR intestinale. Tuttavia, quest'ultima è in grado di convertire solo una piccola parte di GLS (Herr *et al.* 2010). Ciononostante, anche l'attività di questo enzima endogeno, può essere ridotta notevolmente in seguito ad insulti meccanici o a terapie con antibiotici, contribuendo ulteriormente ad una diminuzione di ITC biodisponibili (Shapiro *et al.* 1998).

2.7 ASSORBIMENTO E DISTRIBUZIONE

Nonostante i GLS siano molecole con caratteristiche acide e idrofiliche, diversi studi descrivono un loro assorbimento a livello intestinale (Bheemreddy *et al.* 2007, Cwik *et al.* 2010). Date queste caratteristiche chimiche, è stato ipotizzato un loro assorbimento passivo a livello gastrico, mentre nell'intestino avverrebbe attraverso pori acquosi, mediante trasporto attivo o facilitato (Holst *et al.* 2004).

Diversamente dai loro precursori, gli ITC, grazie alle caratteristiche lipofile, al peso molecolare relativamente basso e alle ridotte dimensioni, presentano un alto coefficiente di ripartizione acqua-ottanolo, che favorisce il loro assorbimento intestinale per diffusione passiva. La disponibilità tissutale degli ITC inoltre, è stata descritta essere di circa sei volte superiore rispetto ai GLS intatti (Shapiro *et al.* 2001). Da ciò, risulta un efficiente assorbimento degli ITC, come descritto in diversi lavori, che riportano che il picco massimo di concentrazione plasmatica viene raggiunto rapidamente, come per il SFN, in cui la C_{max} viene raggiunta dopo un'ora dalla somministrazione.

Dopo un rapido assorbimento, il livello di ITC nel plasma diminuisce a causa di un'altrettanta rapida distribuzione nei tessuti che segue una cinetica di primo ordine (Ye *et al.* 2002).

Gli ITC sono composti altamente elettrofili, e reagiscono facilmente con gli atomi di N, O, or S di nucleofili. Possono per esempio reagire spontaneamente con i gruppi sulfidrilici, come quelli del glutatione (GSH), dando origine al corrispondente ditiocarbammato (coniugati GSH-ITC). All'interno della cellula gli ITC vengono coniugati con il GSH, da parte dell'enzima glutatione-S-transferasi (GST). L'equilibrio tra ITC liberi e coniugati, ed il livello intracellulare di GSH rappresentano i determinanti fondamentali per il passaggio attraverso le membrane cellulari e per l'*uptake* cellulare (Zhang 2001, Valgimigli *et al.* 2009). Le rapide interazioni con gruppi tiolici, come quelli del GSH, generano un gradiente di concentrazione che facilita un ulteriore accumulo intracellulare di ITC, fino a raggiungere concentrazioni millimolari, anche 200 volte superiori a quelle extracellulari (Zhang 2004). Una volta accumulati nella cellula, i coniugati GSH-ITC vengono escreti dalla proteina di trasporto associata alla resistenza dei farmaci (MRP-1) e dalla glicoproteina P (Pgp-1), per raggiungere la circolazione sanguigna (Figura 2.7).

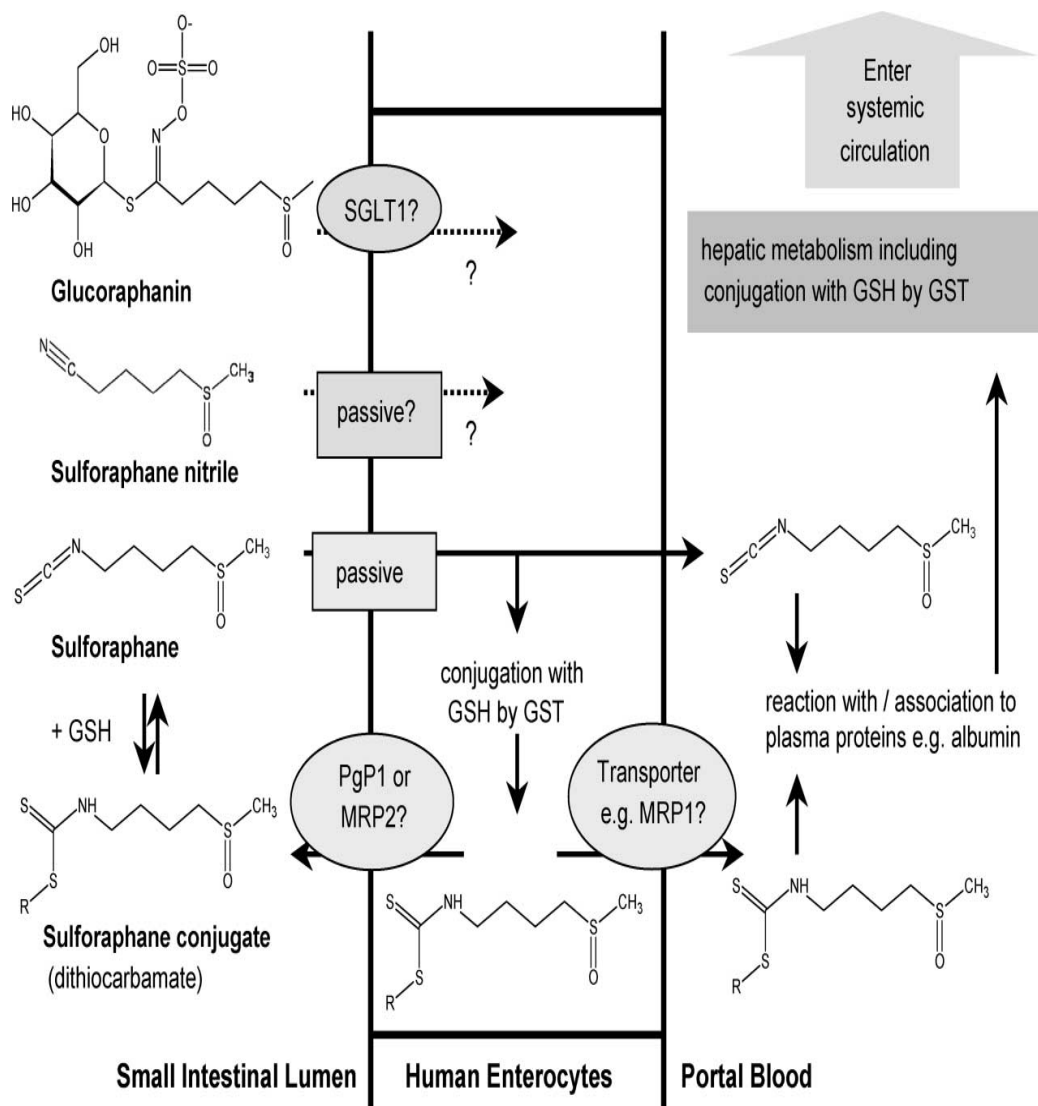
É plausibile che gli ITC vengano trasportati legati a proteine plasmatiche, come l'albumina, interagendo possibilmente con il gruppo -SH, o in forma libera, seppur in piccola parte (Holst *et al.* 2004).

La distribuzione ai tessuti avviene per diffusione passiva attraverso le membrane, seguendo un meccanismo medesimo a quello descritto per l'assorbimento intestinale, in cui il legame con GSH risulta il fattore chiave. Uno studio, effettuato tramite autoradiografie sull'intero corpo di ratti, ha mostrato che, oltre al tratto gastrointestinale, al fegato e ai reni, che sono gli organi deputati all'assorbimento e all'eliminazione degli ITC, solo nel sangue erano presenti elevati livelli di ITC (Holst *et al.* 2004, Conaway *et al.* 2001).

Poco è ancora conosciuto riguardo ai GLS indolici, e il cui prodotto di idrolisi principale è l'I3C che si forma nell'ambiente acido dello stomaco, e

che successivamente viene convertito nei prodotti di condensazione 3,3'-diindolimetano (DIM) e indolo(3,2-b)carbazolo. Questi prodotti sono stati determinati a livello epatico nel ratto, suggerendo così un loro assorbimento intestinale, anche se il meccanismo non è stato ancora studiato in modo specifico (De Kruif *et al.* 1991). Un altro studio, utilizzando I3C marcato radioattivamente, ha osservato un accumulo dei suoi metaboliti nel fegato, principalmente DIM, e un'escrezione tramite la bile, in trote trattate con I3C (Dashwood *et al.* 1989).

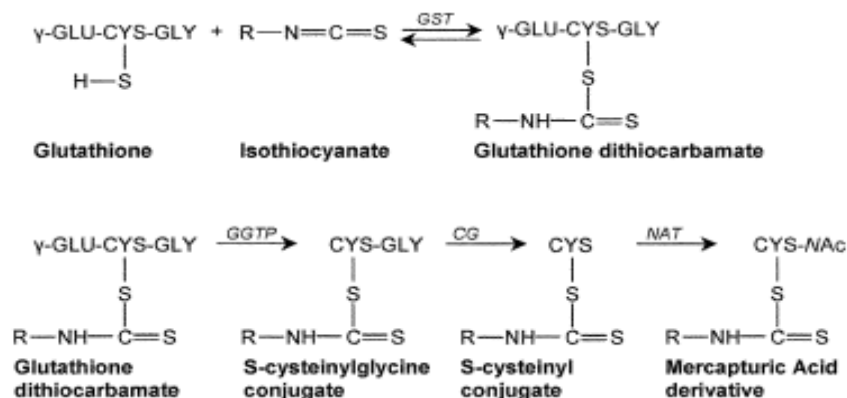
Figura 2.7. Meccanismo ipotizzato per l'assorbimento intestinale e il metabolismo di primo passaggio di glucorafanina e sulforafane.



2.8 METABOLISMO ED ESCREZIONE

L'osservazione, solamente di piccole quantità, di GLS intatti nelle feci e nelle urine, suggerisce che questi composti vengano prontamente assorbiti e metabolizzati. Dopo essere stati idrolizzati dall'enzima MYR vegetale (per esempio durante la masticazione), o dall'isoforma intestinale, il loro metabolismo *in vivo* prosegue attraverso la via dell'acido mercapturico. In primo luogo si assiste alla coniugazione del gruppo $-N=C=S$ degli ITC con il GSH, tramite una reazione che può avvenire sia spontaneamente che attraverso il coinvolgimento dell'enzima GST (Meyer *et al.* 1995). Questa reazione, dopo l'assorbimento, avviene presumibilmente nel fegato, che contiene non solo alte concentrazioni di GSH, ma è anche l'organo con la più alta attività della GST dell'organismo, che permette un'efficace coniugazione degli ITC, e un loro ingente accumulo negli epatociti, con conseguente deplezione di GSH (Zhang *et al.* 1995). Gli ITC, una volta coniugati, subiscono ulteriori modificazioni enzimatiche da parte degli enzimi γ -glutamiltanspeptidasi (GGTP), cisteinilglicinasi (CGase), e N-acetiltransferasi (NAT), coniugandosi per esempio con cisteina e l' N-acetilcisteina, che in fine conducono alla formazione di acido mercapturico e dei suoi derivati ditiocarbammati (Figura 2.8). I reni sono i principali organi deputati a queste reazioni, in cui i metaboliti finali, data la loro idrofilia, possono facilmente essere escreti con le urine (Keum *et al.* 2004).

Figura 2.8. Metabolismo degli isotiocianati.



Numerosi studi hanno mostrato infatti, che, l'assunzione dietetica di ITC può essere valutata determinando i coniugati con N-acetilcisteina (NAC) nelle urine (Holst *et al.* 2004).

Gli ITC sono inoltre sottoposti a metabolismo di fase I, che da origine ad un largo spettro di metaboliti coniugati, a seconda della loro struttura chimica, tramite per esempio reazioni di ossidazione del gruppo solfuro dell'erucina, riduzione del gruppo sulfossido e deidrogenazione del SFN. Queste reazioni, che avvengono principalmente a livello epatico, possono contribuire ulteriormente a ridurre la concentrazione di ITC rilevata nel sangue o nelle urine (Kassahun *et al.* 1997).

Il sistema di monoossigenasi a funzione mista e alcol deidrogenasi, sono coinvolte anche nel metabolismo dell'I3C, dando origine a due metaboliti principali, l'indolo-3-carbossilato e il 2,3-diidro-2-idrossiindolo-3-carbossilato.

Ciononostante, la via metabolica principale di queste molecole risulta essere la coniugazione con mercaptani (Rungapamestry *et al.* 2007, Zhang 2012a).

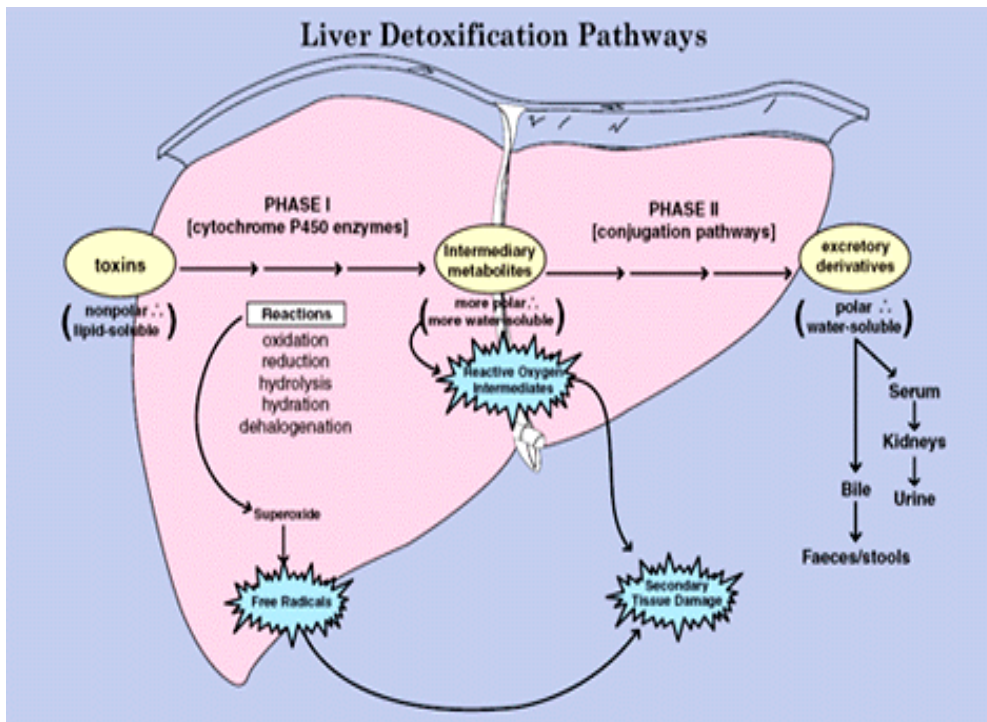
CAPITOLO 3

ENZIMI DEL METABOLISMO DEGLI XENOBIOTICI

3.1 INTRODUZIONE

Gli xenobiotici sono sostanze naturali o di sintesi, estranee all'organismo, come gli agenti inquinanti, i pesticidi, le tossine, i metaboliti di origine vegetale, gli additivi alimentari e i farmaci, con cui l'uomo viene a contatto. Attraverso reazioni di biotrasformazione, queste molecole potenzialmente dannose, generalmente lipofile e prive di carica elettrica, vengono convertite in prodotti maggiormente polari e idrosolubili, con il fine di essere eliminate in modo efficiente e veloce dall'organismo. Queste reazioni sono catalizzate dagli enzimi del metabolismo degli xenobiotici, attraverso reazioni di fase I o di funzionalizzazione, reazioni di fase II o di coniugazione, e reazione di fase III o di deconiugazione e trasporto (Figura 3.1). Questi passaggi sono fondamentali per la detossificazione di molecole potenzialmente pericolose, ciononostante possono anche determinare la trasformazione e l'attivazione di composti, inizialmente inerti, in metaboliti altamente instabili e reattivi, con caratteristiche tossiche, mutagene o cancerogene. Questo sistema metabolico è inoltre coinvolto in diverse funzioni cellulari e sistemiche, grazie alla loro capacità di riconoscere una vasta gamma di substrati endogeni come ormoni steroidei, colesterolo, acidi biliari, acidi grassi, vitamina A e D, prostaglandine e altri eicosanoidi (Orellana *et al.* 2004). Gli enzimi di questo sistema sono caratterizzati da un'ampia specificità di substrato: i siti catalitici degli enzimi sono infatti in grado di adattarsi in modo specifico ad una notevole varietà di substrati di diverse forme, dimensioni e caratteristiche stereochimiche (Scott *et al.* 2003).

Figura 3.1. Rappresentazione schematica del metabolismo epatico degli xenobiotici.



3.2 LOCALIZZAZIONE DEGLI ENZIMI DEL METABOLISMO DEGLI XENOBIOTICI

La sede principale del metabolismo degli xenobiotici è il fegato, a livello del quale, sono presenti elevate concentrazioni di enzimi metabolizzanti. Questi catalizzatori sono espressi in modo ubiquitario, e sono presenti, oltre che nel fegato, anche nei principali siti di esposizione agli xenobiotici, come la mucosa nasale, la cute, i polmoni, il tratto gastrointestinale, i reni, le ghiandole surrenali, la milza, il pancreas, il cuore, il cervello, i testicoli, e le ovaie (Orellana *et al.* 2004). A livello subcellulare, questi enzimi sono localizzati principalmente nella membrana del reticolo endoplasmatico liscio (REL), nel citosol, nella membrana dei mitocondri, nella membrana nucleare, e in misura minore, nei lisosomi e nel plasmalemma (Neve *et al.* 2008). La biotrasformazione degli xenobiotici, che avviene a livello di vari

tessuti ed organi mediante meccanismi d'azione diversi, può inoltre comportare notevoli implicazioni tossicologiche, soprattutto per quanto riguarda la selettività del danno tossico.

Per studiare le attività svolte dagli enzimi del metabolismo degli xenobiotici legati al REL può essere effettuata un'omogeneizzazione del tessuto di interesse seguita da un frazionamento dei costituenti subcellulari. In questo modo le membrane lipoproteiche del REL assumono la forma di particolari vescicole chiamate microsomi, che mantengono inalterate la maggior parte delle caratteristiche morfologiche e funzionali delle membrane e delle proteine annesse, permettendone così lo studio dell'attività catalitica (Paolini *et al.* 1997).

3.3 LE FASI DELLA BIOTRASFORMAZIONE

3.3.1 REAZIONI DI FASE I

Le reazioni di fase I sono definite di funzionalizzazione in quanto hanno l'obiettivo di introdurre o mettere in evidenza gruppi funzionali come -OH, -SH, -COOH, -NH₂, trasformando i composti iniziali in metaboliti più polari.

Le principali reazioni di fase I sono:

- **Ossidazioni:** rappresentano, in termini quantitativi, il gruppo più importante. Gli enzimi coinvolti sono in grado di intervenire in numerosi tipi di reazioni: idrossilazione aromatica e alifatica; N-, O-, S-dealchilazione ossidativa; ossidazione di mono- e di-ammine; S- e N-ossidazione di ammine primarie, secondarie e terziarie; deamminazione; desulfurazione; dealogenazione ossidativa; deidrogenazione di alcol e aldeidi; ossidazione di purine. I sistemi enzimatici maggiormente implicati nelle reazioni di ossidazione sono il sistema monoossigenasico citocromo P450-dipendente (o

ossidasi a funzione mista) e il sistema delle amminossidasi a funzione mista (flavin-monoossigenasi o FMO) (Guengerich 2006).

- **Epossidazione:** si tratta della conversione degli idrocarburi alifatici nei rispettivi epossidi che si verifica come conseguenza dell'inserzione di un atomo di ossigeno in un doppio legame tra due atomi di carbonio.
- **Riduzioni:** sono meno numerose e sono catalizzate da enzimi come l'alcol-ossidoreduttasi, la chetoreduttasi e l'aldeide reduttasi, che agiscono su idrossilammine, su composti contenenti gruppi azo-, nitro-, carbonilici, disolfuri e alcuni composti alogenati. Le azo- e le nitro-riduzioni possono essere catalizzate dal sistema monoossigenasico citocromo P450-dipendente, ma anche da enzimi flavoproteici.
- **Idrolisi:** sono reazioni presenti anche nella fase III del metabolismo. I principali tipi di idrolisi riguardano esteri, ammidi, glucosidi (in particolare quelli cardioattivi come la digitossina) e contaminanti ambientali come gli organofosfati (Fuccella *et al.* 1998).
- **Dealogenazioni:** possono essere di tipo riduttive, ossidative oppure risultanti nella formazione di doppi legami C-C.

In generale, i sistemi enzimatici maggiormente implicati nelle reazioni di fase I, e che apportano il maggior contributo al metabolismo degli xenobiotici sono il sistema monossigenasico citocromo P450-dipendente e il sistema delle amminossidasi a funzione mista (Guengerich 2006).

3.3.2 REAZIONI DI FASE II

In seguito alle reazioni di funzionalizzazione si vengono a formare diversi metaboliti che, se sufficientemente polari, vengono eliminati attraverso

l'escrezione renale, altrimenti vanno incontro ad un'ulteriore biotrasformazione effettuata dagli enzimi di fase II. Le reazioni di fase II o reazioni di coniugazione, permettono alla molecola di acquisire le caratteristiche di idrosolubilità e polarità necessarie per essere eliminate.

I prodotti biotrasformati nelle reazioni di fase I prendono parte a reazioni di coniugazione con sostanze endogene, dando origine a composti coniugati. La formazione di questi composti coinvolge intermedi ad alta energia ed enzimi specifici, come le transferasi, che possono essere localizzati sia nei microsomi che nel citoplasma. Esse catalizzano l'accoppiamento di una sostanza endogena attivata, come l'acido glucuronico, acetico e solforico, il GSH, gli amminoacidi e gruppi metilici, con uno xenobiotico o un suo metabolita. Le reazioni di coniugazione sono state considerate come vere e proprie reazioni di "detossificazione" che ponevano fine all'azione delle sostanze estranee introdotte nell'organismo. Tuttavia, questo concetto è stato ormai superato dal momento in cui è stato scoperto che alcune di queste reazioni sono in grado di bioattivare una grande varietà di composti e molecole tossiche, e possono portare alla formazione di specie reattive responsabili di epatotossicità (Paolini *et al.* 2003).

Le principali reazioni di fase II sono:

- **Coniugazione con acido glucuronico:** è la principale reazione di eliminazione degli xenobiotici. È caratterizzata dalla formazione di un legame glicosidico tra acido glucuronico e un gruppo nucleofilo del substrato -OH, -SH, -CH, -COOH, -NH, -NH₂. L'acido glucuronico viene trasportato dal coenzima attivato, l'acido uridindifosfoglucuronico (UDPGA) e la reazione è catalizzata dalle UDP-glucuroniltransferasi (UDPGT), presenti sia nel citosol che nei microsomi. Mentre l'enzima solubile non è inducibile, l'enzima microsomiale subisce l'influenza dei processi di modulazione. Inoltre, dato che l'UDPGT si trova a livello delle membrane dei microsomi, riveste un ruolo importante, in quanto può avere accesso

diretto ai prodotti che si formano dalle reazioni di fase I per azione del citocromo P450. Le UDPGT si trovano prevalentemente nel fegato, ed in misura ridotta anche in altri tessuti, come rene, intestino, cute, cervello, milza e mucosa nasale (King *et al.* 2000).

- **Coniugazione con il glutatione:** questa reazione è caratterizzata dalla formazione di un legame tioetere tra il GSH ridotto, il γ -L-glutamyl-L-cisteinil-glicerina, e substrati elettrofili potenzialmente tossici come gli epossidi. Tale reazione è catalizzata dalla superfamiglia delle GST, proteine multifunzionali, pressoché ubiquitarie, a carattere dimerico, che possono rappresentare fino al 10 % delle proteine solubili nel citosol epatico. Le isoforme di GST sono enzimi coinvolti non solo nel sistema di detossificazione ma dotati anche di altre attività come l'eliminazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Sheehan *et al.* 2001).
- **Solfatazione:** questa reazione è catalizzata dalla superfamiglia delle solfo-transferasi (SULT), enzimi solubili situati nel fegato, nel rene, nel tratto intestinale e nel polmone. Esse trasferiscono il gruppo SO_3^- dal 3'-fosfoadenosina-5' fosfosolfato (PAPS) ai gruppi nucleofili -OH, -SH, -NHOH, -NH₂, dei substrati con rilascio di 3'-fosfoadenosina-5' fosfato (PAP) (Glatt *et al.* 2001).
- **Metilazione:** è una reazione catalizzata dagli enzimi metiltransferasi, O-metiltransferasi, N-metiltransferasi, S-metiltransferasi, che trasferiscono un gruppo metilico, dal donatore attivato S-adenosilmetionina (SAM) a metalli come arsenico, mercurio e selenio, e a gruppi nucleofili -OH di fenoli e catecoli, -NH₂ di composti alifatici, aromatici, eterociclici, -SH di substrati endogeni ed esogeni con rilascio di S-adenosilomocisteina.
- **Acetilazione:** è tra le vie di biotrasformazione degli xenobiotici più diffusa. Un esempio è dato dalle ammine aromatiche convertite in ammidi. Tra gli enzimi coinvolti, l'N-acetiltransferasi (NAT), che

catalizza il trasferimento del gruppo acetile attivato (-COCH₃) trasportato dall'acetil coenzima A (AcetilCoA) alle ammine. Esistono due isoforme enzimatiche: NAT1 espressa nel fegato e in altri tessuti, e NAT2, esclusivamente epatica (Weber 1997).

- **Acilazione:** si tratta di un processo coniugativo in cui i substrati, prevalentemente acidi carbossilici, vengono attivati dall'acilCoA ligasi in acilCoA-tioesteri. Questi ultimi reagiscono con il gruppo amminico di un amminoacido per formare un coniugato ammidico in una reazione catalizzata dalla acilCoA-amminoacido N-aciltransferasi (Fuccella *et al.* 1998).

3.3.3 REAZIONI DI FASE III

Le reazioni di fase III sono meno note, ma molto importanti; si tratta di trasporti extracellulari catalizzati da proteine trans-membrana e, catalisi svolte dalla flora batterica. Le reazioni di trasporto extracellulare sono effettuate da particolari proteine transmembrana come la glicoproteina-P (P-gp), la proteina associata alla farmaco resistenza multipla (MRP), e il polipeptide 2 trasportatore degli anioni organici (OATP2). Esse provvedono a creare una barriera contro l'ingresso degli xenobiotici nella cellula e giocano un ruolo fondamentale nell'assorbimento, distribuzione ed escrezione del composto. Queste proteine sono dette proteine di efflusso o *ATP binding cassette (ABC) transporter* in quanto sfruttano l'energia dell'idrolisi dell'ATP per estrudere i substrati al di fuori della cellula, diminuendone così la concentrazione intracellulare. La P-gp, MRP e OATP2 sono trasportatori dotati di bassa specificità di substrato; trasportano, infatti, composti di natura lipofila strutturalmente molto diversi tra loro. Sono principalmente localizzate sull'orletto a spazzola degli enterociti intestinali e della cellule epiteliali dei tubuli prossimali renali, sulla membrana che circonda i canalicoli biliari nel fegato, nelle cellule endoteliali della barriera ematoencefalica e sul versante apicale di molte

altre cellule polarizzate (Mizuno *et al.* 2003). Essendo frequentemente espresse nelle cellule tumorali, le proteine di efflusso sono state associate al fenomeno della farmaco resistenza multipla, cioè la capacità delle cellule cancerose di resistere all'attività antiblastica di un farmaco, al quale sono state ripetutamente esposte e successivamente anche a quelle di agenti con i quali non sono state mai trattate (Hawkey 2008).

Le reazioni di fase III comprendono principalmente: idrolisi di glucuronidi, idrolisi di acidi mercapturici (coniugati con GSH), aromatizzazioni, e riduzioni di composti precedentemente ossidati dal fegato. In questo modo, i processi metabolici operati dal fegato nelle precedenti fasi, possono essere capovolti, consentendo così l'instaurarsi di un ricircolo enteroepatico: i composti metabolizzati nel fegato ed escreti tramite la bile nell'intestino, in questa fase vengono ripristinati e riassorbiti.

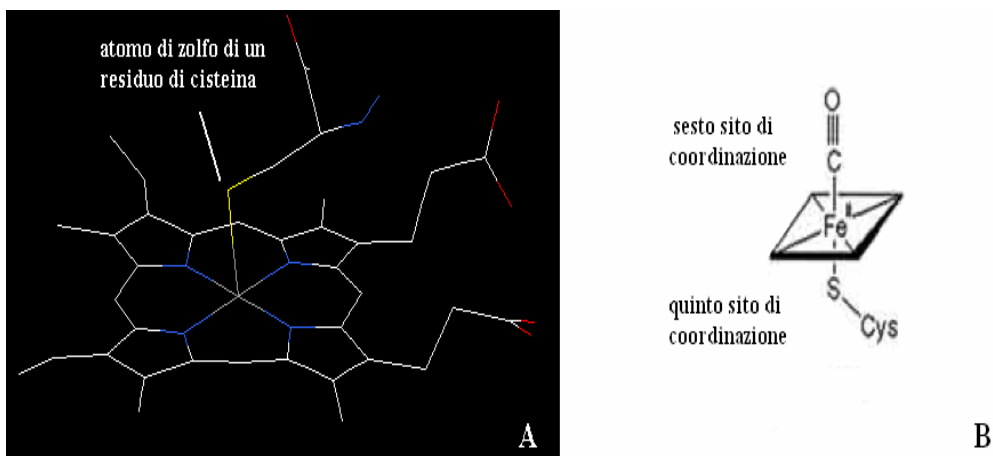
3.4 IL SISTEMA MONOSSIGENASICO CITOCROMO P450-DIPENDENTE

Per molte sostanze sia di origine esogena che endogena il metabolismo ossidativo rappresenta lo *step* iniziale del processo di biotrasformazione. I sistemi enzimatici coinvolti nelle reazioni di fase I sono numerosi, ma il principale è quello delle monoossigenasi a funzione mista, il quale comprende il sistema multienzimatico del CYP450 e delle monoossigenasi flaviniche.

Le monoossigenasi sono gli enzimi che intervengono nelle reazioni di ossidazione. Sono in grado di trasferire un atomo di ossigeno nel substrato e di ridurre l'altro atomo di ossigeno ad acqua, in presenza di ossigeno molecolare e della forma ridotta del coenzima NADPH (nicotinammide adenina dinucleotide fosfato). Le reazioni di ossidoriduzione catalizzate dalle monoossigenasi coinvolgono un sistema ossidativo rappresentato da due enzimi accoppiati: la flavoproteina NADPH citocromo P450 reduttasi e il citocromo P450 (CYP450) (Ahn *et al.* 2007).

Il CYP450, l'enzima principale del sistema monoossigenasico, a livello del REL, presenta una ferroprotoporfirina IX come gruppo prostetico, inserita in una tasca idrofobica o in una depressione sulla superficie dell'apoproteina, legata ad essa per mezzo di interazioni idrofobiche e grazie ad un legame di coordinazione tra l'atomo di ferro al centro dell'anello tetrapirrolico ed un residuo di cisteina dell'apoproteina. Il ferro dell'anello tetrapirrolico dell'eme può essere sia penta- che esa- coordinato; infatti, oltre ai quattro legami planari con gli atomi di azoto della protoporfirina IX e il quinto legame con il gruppo -SH della cisteina dell'apoproteina, l'atomo di ferro può stabilire un sesto legame piuttosto labile con un atomo di ossigeno di una molecola d'acqua o, negli eucarioti, con un atomo di ossigeno dell'acido oleico appartenente al reticolo endoplasmatico. Nel caso in cui l'atomo di ferro venga ridotto allo stato ferroso (Fe^{2+}), quest'ultimo legame viene stabilito con l'ossigeno molecolare (Figura 3.2).

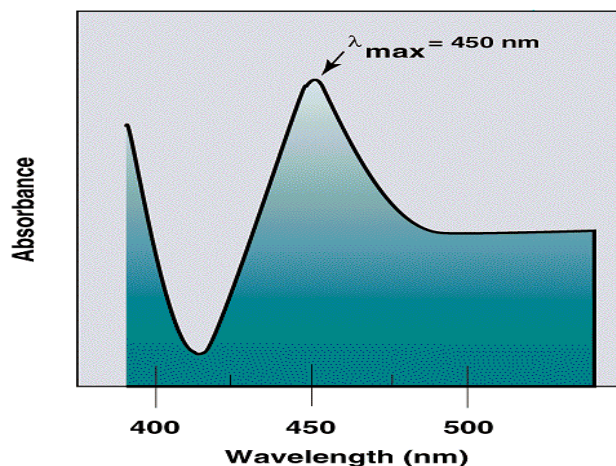
Figura 3.2. Gruppo prostetico eme (Fe-protoporfirina IX) dei CYP_S.



Il nome CYP450 deriva dalle caratteristiche del suo spettro di assorbimento: nella sua forma ridotta (ferrosa), quando lega il monossido di carbonio formando un complesso CO-citocromo, presenta un picco di assorbimento a 450 nm (Figura 3.3).

Il contenuto relativo, e la quantità di CYP450 nelle cellule, variano a seconda della specie, del tipo di tessuto, dall'età, dallo stato di salute, dal genere e dall'esposizione del soggetto agli xenobiotici.

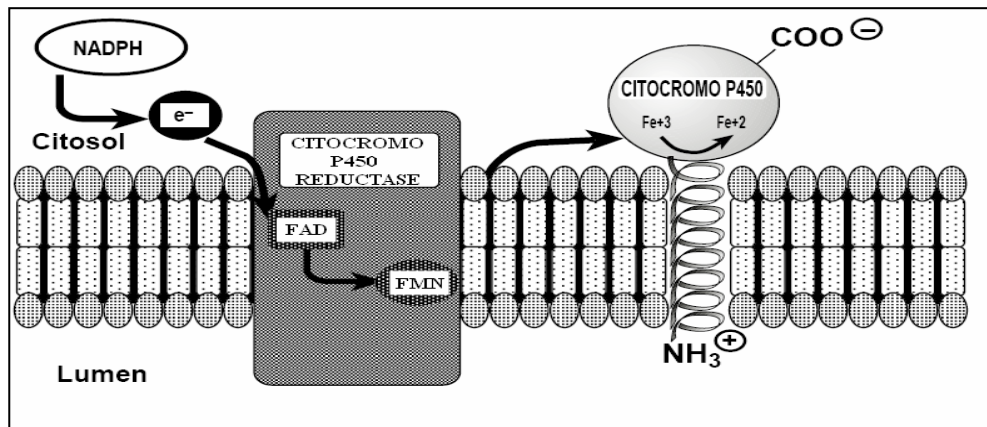
Figura 3.3. Spettro di assorbimento del citocromo P450.



Le diverse isoforme di CYP450 differiscono sia nella struttura della catena peptidica, che nella specificità delle reazioni catalizzate. Nonostante queste differenze, risultano altamente conservate quelle zone che sono funzionalmente importanti, come la regione che lega l'ossigeno o il gruppo eme, il sito di trasferimento elettronico tra la reduttasi ed il CYP450 (Werk-Reichhart *et al.* 2000).

Il sistema NADPH-citocromo P450 reduttasi è necessario per il corretto funzionamento del CYP450. Si tratta di una flavoproteina avente un flavinmononucleotide (FMN) ed un flavinadeninnucleotide (FAD); tale enzima catalizza il trasferimento di elettroni dal coenzima ridotto NADPH al citocromo P450 attraverso i coenzimi FMN e FAD. Presenta un'organizzazione strutturale molto simile a quella del CYP450, è costituita da un dominio N-terminale idrofobo, che ancora la proteina alla matrice fosfolipidica del REL e partecipa alla corretta interazione con i CYP e il core catalitico C-terminale che sporge nel citoplasma (Figura 3.4) (Fluck *et al.* 2007).

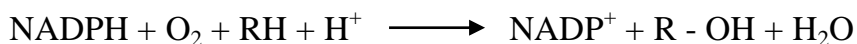
Figura 3.4. Componenti molecolari del sistema del citocromo P450.



3.5 MECCANISMO D'AZIONE DEL SISTEMA MONOSSIGENASICO CITOCROMO P450-DIPENDENTE: LA REAZIONE MONOSSIGENASICA

Il meccanismo della reazione monoossigenasica sembra essere uguale per tutte le isoforme di CYP450, da quelle batteriche a quelle di mammifero, nonostante il grande numero di substrati che il sistema è in grado di metabolizzare.

La reazione può essere schematizzata come segue:



Per ogni molecola di substrato (RH) metabolizzata, viene consumata una molecola di ossigeno la cui rottura porta alla formazione di due atomi di ossigeno: uno di questi viene inserito nel substrato, mentre l'altro è ridotto ad acqua. Gli elettroni del NADPH vengono trasferiti al CYP450 tramite il gruppo prostetico della NADPH-CYP450-reduttasi e successivamente all'ossigeno molecolare che viene attivato (Figura 3.4).

Le varie fasi del meccanismo catalitico del CYP450 possono essere così descritte (Figura 3.5):

- 1) Il substrato (RH) si lega alla forma ossidata del CYP450 (Fe^{3+}) per dare origine a un complesso binario enzima-substrato.

- 2) Il citocromo viene quindi ridotto allo stato Fe^{2+} per acquisizione di un elettrone reso disponibile dal NADPH tramite la CYP450 riduttasi. Poiché la reazione catalizzata dal CYP450 richiede due elettroni, per operare la riduzione del ferro eminico, per legare O_2 e per la sua scissione, un problema essenziale risulta il meccanismo di trasferimento diretto e simultaneo degli elettroni del NADPH al CYP450. Il NADPH e il NADH sono donatori di due elettroni, mentre il CYP450 può accettarne uno per volta. E' necessario il coinvolgimento di una proteina, nel corso di questo trasferimento di elettroni, che sia in grado di accettare due elettroni e di cederne uno per volta, cioè la NADPH-citocromo P450 riduttasi. Il FAD funge da sito accettore per gli elettroni provenienti dal NADPH, mentre FMN funge da sito donatore e trasferisce un elettrone per volta al CYP450.

- 3) Il complesso substrato-citocromo ridotto, incorpora una molecola di ossigeno nel sesto sito di coordinazione dell'eme formando il complesso $\text{Fe}^{2+} - \text{O}_2$ in equilibrio con la specie $\text{Fe}^{3+} - \text{O}_2^-$.

- 4) Entra in gioco il secondo elettrone messo a disposizione dal NADPH. Il risultato della seconda riduzione è la formazione del complesso $\text{Fe}^{2+} - \text{O}_2^-$ in equilibrio con la specie $\text{Fe}^{3+} - \text{O}_2^{2-}$.

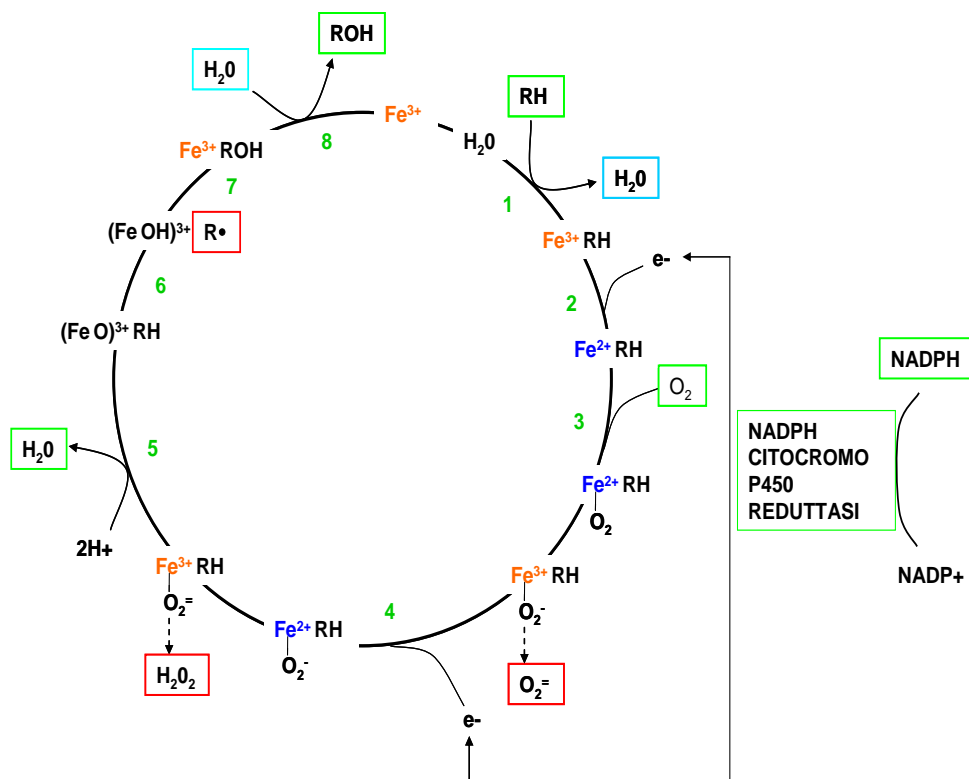
- 5) L'ossigeno reagisce con due 2H^+ generando una molecola di acqua e il complesso FeO^{3+} .

- 6) L'ossigeno del FeO^{3+} è altamente reattivo e sottrae al substrato un atomo di idrogeno, generando così il radicale $\text{R}\cdot$.

7) Il gruppo -OH che si è formato nel core catalitico del CYP450 reagisce successivamente con il radicale R• che viene così idrossilato e rilasciato a favore di una molecola di acqua (Lewis 2003).

Da questo ciclo catalitico, tuttavia, la formazione di diverse specie di ROS, risulta piuttosto probabile.

Figura 3.5. Ciclo catalitico del sistema monoossigenasico citocromo P450 dipendente.

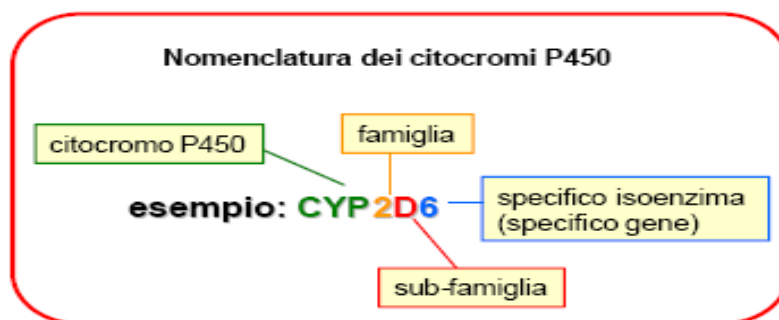


3.6 NOMENCLATURA ED ISOFORME DI CITOCROMO P450

Nel sistema delle monoossigenasi, la varietà delle proprietà catalitiche trova la sua origine nella diversità della struttura della parte apoproteica del citocromo P450. Secondo il grado di omologia tra le sequenze amminoacidiche primarie che lo costituiscono, secondo criteri filogenetici e di organizzazione genetica, i CYPs sono stati divisi in famiglie e sotto

famiglie, che permette di individuare, in maniera univoca un isoenzima (Figura 3.6).

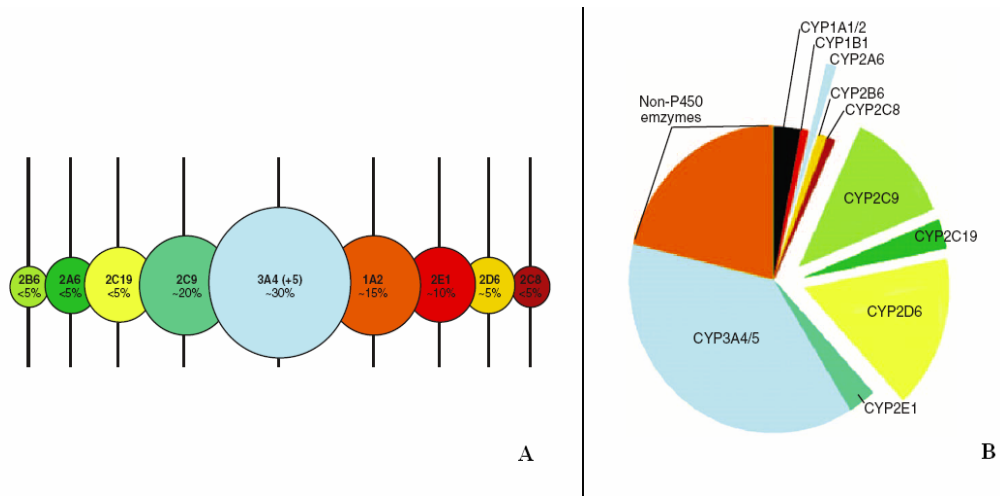
Figura 3.6. Nomenclatura dei citocromi P450.



Sono state descritte circa 200 famiglie di P450, di cui 15 esistono in tutti i mammiferi. Ciascuna specie di mammifero possiede un alto numero di geni codificanti per diverse isoforme: nel ratto sono stati sequenziati 84 geni, nel topo 103 e nell'uomo 57, più 47 pseudogeni. Le famiglie maggiormente studiate fino ad ora sono le prime quattro, e prevalentemente nei mammiferi, le prime tre (CYP 1, 2, 3) sono implicate soprattutto nel metabolismo degli xenobiotici; la quarta (CYP 4) metabolizza sia sostanze esogene che endogene, mentre le altre famiglie (CYP 5 – 51) sono deputate soprattutto al metabolismo di sostanze endogene come: il metabolismo di ormoni steroidei, steroidi, prostaglandine, trombossani, leucotrieni, acidi grassi, acidi biliari e alcune vitamine (A e D) (Figura 3.7) (Lewis *et al.* 2003, Guengerich 2003). Il CYP1A1 per esempio è responsabile del metabolismo dei PHA; il CYP1A2 della diossina, di alcuni farmaci (es. warfarin, antipirina, acetaminofene), e nel metabolismo dell'eme e degli estrogeni; il CYP1B1 è coinvolto nella bioattivazione di molecole cancerogene (Nerbert *et al.* 2002); il CYP2E1 è coinvolto nel metabolismo di farmaci, come acetaminofene, nitrosammine e anestetici generali, anche se è principalmente conosciuto per il suo ruolo nel metabolismo dell'etanolo, che è anche un suo induttore; i CYP3A sono responsabili del metabolismo ossidativo di un'ampia varietà di substrati: metabolizzano circa 120 diversi

xenobiotici e sono implicati nel metabolismo del 60% dei farmaci in circolazione, tra cui antibiotici, benzodiazepine, analgesici oppioidi, caffeina e ipnotici non benzodiazepinici, e sono coinvolti nella bioattivazione di precancerogeni come PHA e la nitrosammina NNK contenuta nel fumo di sigaretta.

Figura 3.7. Composizione del contenuto totale del citocromo epatico (A), e contributo delle diverse isoforme al metabolismo ossidativo degli xenobiotici (B).



CAPITOLO 4

MODULAZIONE DEGLI ENZIMI DEL METABOLISMO DEGLI XENOBIOTICI E TEORIA CHEMIOPREVENTIVA

4.1 INTRODUZIONE

Secondo la teoria chemiopreventiva classica gli enzimi di fase I presentano attività “bioattivante” mentre gli enzimi di fase II sono caratterizzati da attività “detossificante”. Tale definizione deriva dalla capacità dei primi di convertire precancerogeni in cancerogeni attivi in grado di danneggiare il DNA e altre macromolecole cellulari, e anche dalla capacità degli enzimi di fase II di coniugare sostanze esogene tossiche con molecole più polari rendendo più facile la loro eliminazione.

Sulla base di tale teoria è stata elaborata una strategia chemiopreventiva fondata sulla modulazione degli enzimi del metabolismo degli xenobiotici, secondo la quale una *up-regulation* degli enzimi di fase II considerati “buoni”, ed una *down-regulation* degli enzimi di fase I considerati “cattivi”, contribuirebbe a proteggere contro gli effetti dannosi di molecole esogene (Talalay 1989, Zhang 2012b).

In realtà, tale concezione sembra essere ormai superata, in quanto non è possibile attribuire assolute proprietà detossificanti o bioattivanti a nessuna classe di enzimi in quanto l’espressione dell’una o dell’altra attività non dipende dall’enzima stesso, ma dalla struttura chimica del substrato e da come questo interagisce: ciascun enzima è quindi in grado di bioattivare alcune sostanze e nello stesso tempo di detossificarne altre (Paolini *et al.* 2003).

Questa duplice natura, bioattivante e detossificante degli enzimi del metabolismo, suggerisce come la modulazione enzimatica possa essere potenzialmente usata come strategia chemiopreventiva su larga scala,

seppure con estrema cautela. Bisogna tenere presente infatti, che questi enzimi svolgono anche altre importanti funzioni: sono coinvolti nel metabolismo endogeno e nel mantenimento dell'omeostasi cellulare, perciò una loro modulazione può determinare uno squilibrio fisiologico. Inoltre si deve considerare anche la variabilità genetica che definisce differenze inter-individuali riguardo la capacità di metabolizzare gli xenobiotici. I polimorfismi genetici, infatti, rappresentano un fattore che tende a complicare l'applicazione di strategie chemiopreventive basate sulla modulazione enzimatica (Paolini *et al.* 1999, Paolini *et al.* 2003).

Le abitudini alimentari, la presenza di patologie, lo stile di vita e le esposizioni ambientali determinano una modulazione chimica (*up-* o *down-regulation*) sul profilo genetico di tipo innato (metabolismo lento, intermedio, rapido e ultrarapido) che codifica per enzimi che hanno una doppia natura bioattivante/detossificante. Tale interazione determina un profilo enzimatico chimico-genetico che è responsabile del dinamismo del metabolismo, il quale rappresenta l'unica variabile in grado di offrire informazioni sulle capacità metabolizzanti di ciascun individuo (Paolini *et al.* 2004a).

4.2 MODULAZIONE DEL SISTEMA MONOSSIGENASICO CITOCROMO P450-DIPENDENTE: INDUZIONE ED INIBIZIONE

L'attività e la concentrazione degli enzimi del metabolismo degli xenobiotici sono influenzate da fattori esogeni, quali farmaci, pesticidi, prodotti di sintesi, di origine naturale e fattori endogeni, definiti nell'insieme "modulatori microsomiali" per la loro capacità di agire su varie isoforme del CYP450 stimolando o inibendo l'attività delle monoossigenasi. L'esistenza del fenomeno induttivo, per esempio può essere dimostrata dal fatto che, nell'epatocita in condizioni basali, cioè in assenza di qualsiasi esposizione a sostanze aventi azione inducente, sono rilevabili circa dodici isoforme diverse del citocromo, mentre la semplice esposizione del soggetto

all'ambiente determina la comparsa di nuove isoforme di questa proteina (Rushmore *et al.* 2004).

È nota l'esistenza di una diversità soggettiva nella capacità di metabolizzare una determinata sostanza; questa variabilità, di carattere genetico/ambientale, si riflette con altrettante differenze in termini di contenuto ed attività catalitica dei citocromi nell'epatocita. Quindi, ogni soggetto deve essere considerato come un individuo dotato di un proprio profilo di CYP450, che non risulta essere statico ma suscettibile alle variazioni determinate da interazioni dinamiche tra il substrato genetico del soggetto e i fattori ambientali.

L'ampia variabilità interindividuale è dovuta a quattro fattori principali: polimorfismi genetici che influenzano l'espressione degli enzimi di fase I, II e III; inducibilità delle isoforme del CYP450 che determina un incremento dell'attività o del contenuto di alcune isoforme in seguito all'esposizione del soggetto a specifiche sostanze; inattivazione delle isoforme del CYP450 che implica una inattivazione dell'attività o del contenuto di alcune isoforme in seguito all'esposizione a specifiche sostanze; manifestazioni patologiche, fattori dietetici e ormonali possono rappresentare una causa di variabilità nell'attività del citocromo CYP450 (Sapone *et al.* 2012).

4.2.1 INDUZIONE

Per induzione enzimatica si intende un meccanismo che determina un incremento della concentrazione intracellulare di uno specifico enzima e/o della sua attività. Numerosi composti si sono mostrati in grado di indurre il CYP450, e tali agenti sono stati suddivisi in due classi: monofunzionali, in grado di indurre l'attività degli enzimi di fase I o II, e bifunzionali, coinvolti nell'induzione degli enzimi sia di fase I, che di fase II.

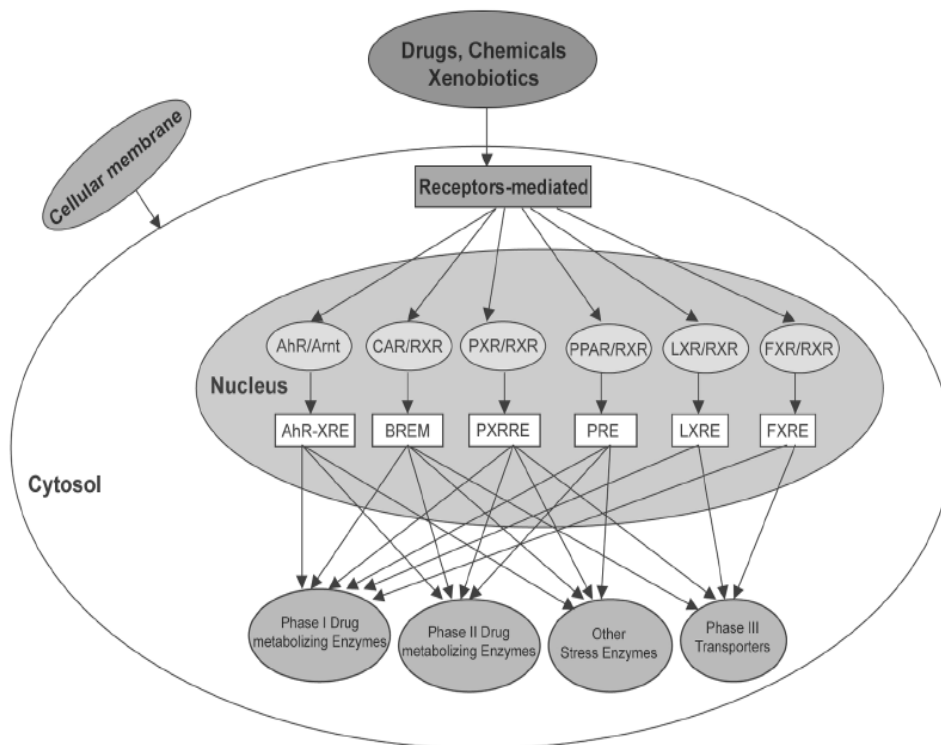
L'induzione può esplicarsi a diversi livelli: trascrizionale, post-trascrizionale e post-traduzionale.

A livello trascrizionale è mediata da recettori orfani, che esprimono le stesse caratteristiche strutturali dei recettori nucleari ormonali. Tali recettori, sono

definiti anche xenosensori, per il loro ruolo di mediatori nella risposta di tipo induttivo evocata dall'esposizione di diversi xenobiotici. (Honkakoski *et al.* 2000). Questi recettori, in generale, possono legare il DNA come monomeri, omo- o etero-dimeri in associazione con il recettore X dei retinoidi (RXR). Le sequenze riconosciute prendono il nome di elementi di risposta agli xenobiotici (*xenobiotics response elements, XRE*), e possono essere presenti nelle regioni regolatrici dei geni per gli enzimi di fase I, II, e III (Handschin *et al.* 2003).

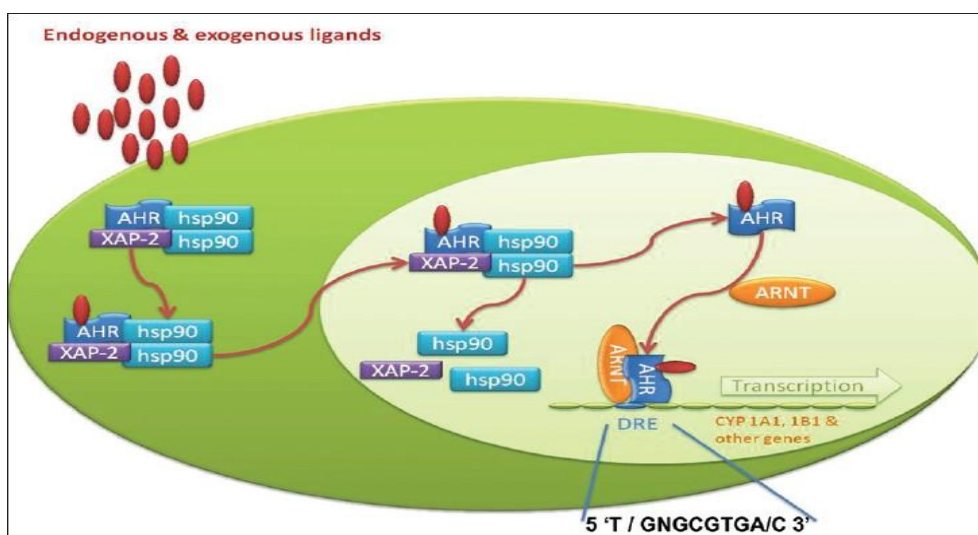
Fra i recettori coinvolti nell'induzione degli enzimi di fase I vi sono per esempio i recettori X per i retinoidi, il recettore X per il pregnano (PXR), i recettori dei proliferatori dei perossisomi (PPAR), il recettore costitutivo per l'androstano (CAR), ed il recettore per gli idrocarburi arilici (AhR) (Figura 3.8).

Figura 3.8. Principali recettori deputati alla regolazione degli enzimi coinvolti nel metabolismo degli xenobiotici



L'AhR in assenza di ligando è localizzato nel citoplasma in un complesso multiproteico che previene l'attivazione trascrizionale del recettore, lo mantiene in una conformazione che facilita il legame con i ligandi e maschera la sua sequenza di localizzazione nucleare. In seguito al legame con il ligando, tale complesso si dissocia e ciò consente al recettore di guadagnare il nucleo dove, in un complesso eterodimerico con il traslocatore nucleare per AhR (ARNT), attiva la trascrizione attraverso il legame ad elementi di risposta alle diossine o agli xenobiotici (DRE o XRE), localizzati nelle regioni promotoriali dei geni per i CYP e per il repressore dell'AhR (AhRR) (Denison *et al.* 2003) (Figura 3.9).

Figura 3.9. Meccanismo di attivazione del recettore per gli idrocarburi arilici.



I ligandi endogeni di questo recettore sono ancora sconosciuti, fatta eccezione per la biliverdina. Tra gli xenobiotici, invece, numerosi sono i composti di origine naturale in grado di attivare l'AhR. Tra questi vi sono flavonoidi, carotenoidi, fenoli, ITC e indoli: si tratta, tuttavia, di ligandi a bassa affinità. I ligandi esogeni ad alta affinità per l'AhR sono invece rappresentati da sostanze idrofobiche e policicliche planari e non planari e tra queste sono annoverati la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-diossina (TCDD), il 3-metilclorantrene (3-MC), il benzo(a)pirene e il β -naftoflavone. Tutte

questa sostanze, attraverso l'AhR, sono in grado di generare una risposta cellulare pleiotropica attivando la trascrizione di numerosi geni tra cui enzimi antiossidanti e di fase II, come la NADPH-chinone ossidoreduttasi, le GST e le UDPGT, e di fase I tra i quali soprattutto le isoforme della famiglia CYP1 (CYP1A1, CYP1A2 e CYP1B1) coinvolte nel metabolismo degli PHA e delle diossine con un conseguente potenziale forte contributo alla cancerogenesi (Bradshaw *et al.* 2009).

I meccanismi che intervengono nel controllo post-trascrizionale sono invece più rari nell'ambito dell'induzione degli enzimi di fase I. Coinvolgono sistemi in grado di agire sul trasporto, sulla stabilità e sullo splicing dell'mRNA neosintetizzato. In particolare, in quest'ultimo contesto è stata dimostrata l'esistenza di differenti tipi di *splicing* dello stesso mRNA con conseguente sintesi di molecole ribonucleoproteiche diverse e dotate di siti iniziali e finali che, proteggendo l'mRNA dall'azione delle ribonucleasi, che determinano differenti caratteristiche di stabilità nel citoplasma durante il trasporto ai ribosomi. (Fuccella *et al.* 1998).

La possibilità di un controllo post-traduzionale dei CYPs in termini di capacità catalitica e di stabilità molecolare, è stata osservata in numerosi casi. Un fattore importante è per esempio il gruppo prostetico eme i cui livelli, però, hanno conseguenze complesse e non del tutto comprensibili. L'effetto di altre molecole quali etanolo e acetone sull'induzione del CYP2E1 appare invece più chiaro: si verifica, infatti, una stabilizzazione dell'enzima attivo senza alcuna variazione dei livelli di mRNA. Alcuni dati ricavati da colture cellulari di epatociti umani dimostrano che il legame con l'induttore determina una protezione della molecola con un sostanziale aumento della vita media dell'enzima (Fuccella *e al.* 1998)

4.2.2 INIBIZIONE

Per inattivazione o inibizione enzimatica si intende una diminuzione dell'attività catalitica e/o del contenuto cellulare di un determinato enzima o

di un sistema enzimatico. Questa modalità di regolazione può essere dovuta a sostanze di origine endogena o esogena.

In genere, un'inattivazione degli enzimi di fase I, viene considerata positiva dal punto di vista chemiopreventivo, in quanto riduce la bioattivazione di composti precancerogeni. D'altro canto, se l'inattivazione riguarda isoforme enzimatiche coinvolte nel metabolismo di farmaci, la conseguenza può essere dannosa, a causa dell'accumulo di farmaco per blocco del suo metabolismo.

L'inattivazione enzimatica può avvenire in diversi modi: attraverso l'inibizione competitiva, in cui due farmaci metabolizzati dallo stesso CYP competono per la stessa isoforma; inibizione non competitiva o suicida, in cui farmaci o xenobiotici si legano al CYP in modo irreversibile determinandone un'inattivazione irreversibile o suicida; inattivazione dei recettori nucleari orfani, in cui il ligando, legandosi al recettore, lo rende trascrizionalmente silente (Fuccella *et al.* 1998).

4.3 MODULAZIONE DEGLI ENZIMI DI FASE II: INDUZIONE ED INIBIZIONE

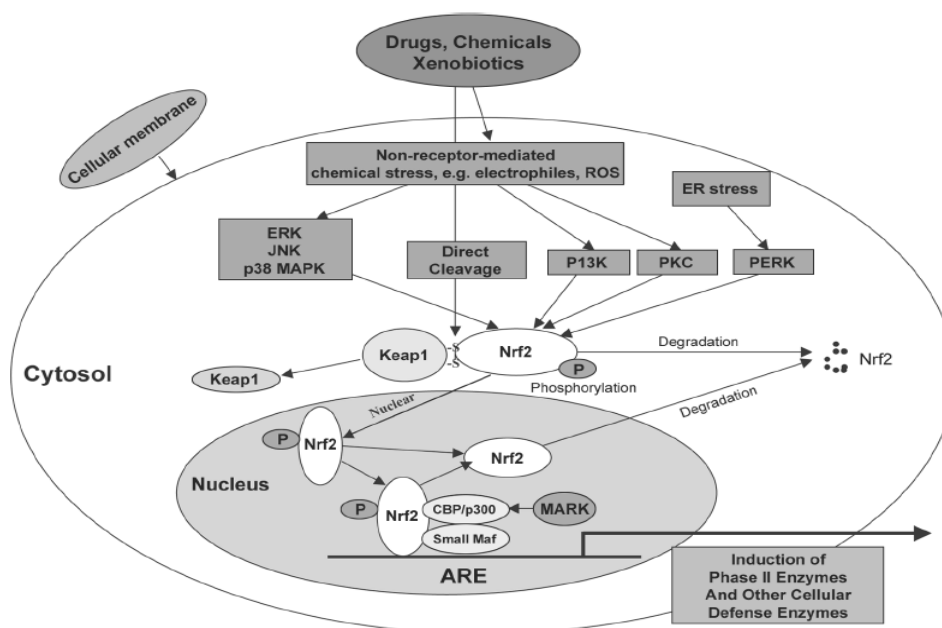
Il meccanismo di regolazione genica degli enzimi di fase II è oggetto di studio ormai da molti anni. Numerosi composti aventi strutture chimiche molto diverse tra loro, dai barbiturici ad alcuni agenti chemio preventivi, come gli antiossidanti fenolici, gli ITC e i flavonoidi, risultano in grado di modulare gli enzimi di fase II.

Esistono molti elementi regolatori coinvolti nella modulazione dei geni degli enzimi di fase II, come per esempio gli *antioxidant response element* (ARE), gli *electrophile response element* (EpRE), gli *xenobiotic response element* (XRE), *aromatic hydrocarbon responsive element* (AhRE), e i fattori nucleari come KB o NF-kB che si legano nelle loro regioni regolatorie (Xu *et al.* 2005).

4.3.1 INDUZIONE

Il meccanismo d'induzione dei geni per gli enzimi di fase II si basa principalmente su due vie di segnalazione che agiscono in modo sinergico: la via delle MAP chinasi (MAPK) e quella del complesso Nrf2-Keap1. Le MAP kinasi, sono importanti molecole di segnalazione che convertono segnali extracellulari (per esempio l'esposizione a xenobiotici), in risposte intracellulari attraverso una cascata di fosforilazioni di numerosi bersagli intracellulari, tra cui la proteina Nrf2, determinante per l'induzione degli enzimi di fase II e antiossidanti (Figura 3.10) (Rushmore *et al.* 2002).

Figura 3.10. Meccanismo di induzione dei geni per gli enzimi di fase II: la via delle MAP chinasi (MAPK) e del complesso Nrf2-Keap1.



Nrf2 è un fattore trascrizionale nucleare, membro della famiglia NF-E2, mentre Keap1 è una proteina citoplasmatica dotata di sensori per lo stress cellulare, come in presenza di ROS o di molecole elettrofile (Levonen *et al.* 2004). In condizioni basali, Keap1 è associato a Nrf2, rendendolo inattivo. In seguito, a segnali di stress, Keap1 subisce cambiamenti conformazionali

per cui si dissocia da Nrf2, il quale, in seguito ad eventi di fosforilazione kinasi dipendenti, trasloca nel nucleo dove forma un eterodimero con la proteina Maf (Dinkova-Kostova *et al.* 2002a). Il complesso formato è così in grado di riconoscere e legarsi alla sequenza regolatrice ARE, presente nei promotori dei geni di fase II e antiossidanti, come per esempio UDP-glucuroniltransferasi, NADPH-chinone ossido riduttasi, e GST (Lee *et al.* 2005).

Un'altra importante via di regolazione di questo sistema enzimatico, avviene tramite l'attivazione del recettore AhR e di altri recettori nucleari orfani che agiscono in modo coordinato modulando gli enzimi metabolici e antiossidanti (Bradshaw *et al.* 2009).

4.3.2 INIBIZIONE

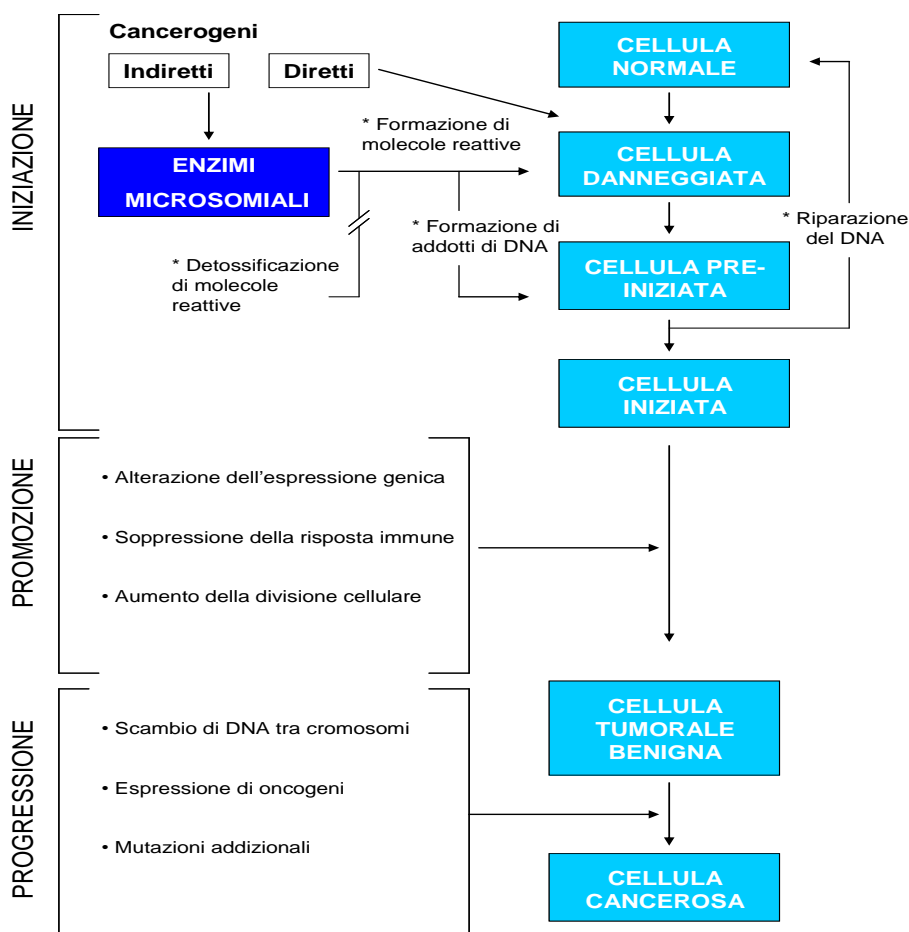
L'inattivazione degli enzimi di fase II è basata su simili meccanismi citati precedentemente per gli enzimi di fase I. Un caso frequente è l'inibizione funzionale dovuta alla deplezione dei cofattori necessari per le reazioni di coniugazione.

CAPITOLO 5

IL RUOLO DEL METABOLISMO NELLA CANCEROGENESI E NELLA CHEMIO PREVENZIONE

La cancerogenesi chimica è un processo multifattoriale e multifasico che si verifica tramite tappe successive, sia a livello genetico che fenotipico. Tipicamente viene suddiviso in tre fasi: iniziazione, promozione e progressione (Figura 4.1).

Figura 4.1. Fasi della cancerogenesi e principali eventi correlati.



L'iniziazione deriva dall'esposizione delle cellule ad un agente cancerogeno genotossico, una sostanza chimica in grado di determinare un danno cromosomico o una mutazione genetica non letale. Tuttavia, poiché si sviluppi il cancro, i bersagli cellulari di tale danno, devono essere coinvolti nella regolazione di importanti funzioni cellulari, come oncogeni, oncosoppressori, geni che regolano l'apoptosi, la riparazione del DNA, e le telomerasi.

I cancerogeni inizianti, sono generalmente molecole elettrofile altamente reattive, che comprendono sia prodotti naturali che di sintesi, con struttura estremamente diverse tra loro, in grado di reagire con componenti cellulari nucleofili, come DNA, RNA e proteine. La maggior parte di essi hanno un'azione indiretta, e sono definiti precancerogeni, in quanto richiedono una conversione metabolica *in vivo*, da parte degli enzimi del metabolismo di fase I, II o III, per dare origine a cancerogeni terminali, capaci di trasformare le cellule, come ad esempio i PHA (Talalay *et al.* 2001).

La promozione è la fase in cui si ha la formazione di un clone preneoplastico benigno in seguito ad espansione clonale della cellula iniziata. Le molecole determinanti per questa fase sono definiti promotori cancerogeni non-genotossici, poiché non svolgono la loro azione direttamente sul DNA, piuttosto tramite meccanismi epigenetici come per esempio l'induzione della proliferazione cellulare, l'attivazione di protossici, premutageni e precancerogeni, e mediante l'aumento dello stress ossidativo; in questi ultimi casi tali molecole vengono definite cancerogeni co-tossici, co-mutageni e co-cancerogeni (Paolini *et al.* 1992, Paolini *et al.* 1994).

La fase di progressione, è caratterizzata da un'ulteriore proliferazione del clone cellulare da parte di agenti promotori, con conseguente acquisizione di mutazioni addizionali, fino a sviluppare un tumore maligno.

La chemio prevenzione è basata sull'uso di agenti chimici, sia di origine naturale che sintetica, in grado di inibire, ritardare o evitare l'insorgenza del cancro (Sporn *et al.* 2002).

Gli agenti chemiopreventivi vengono suddivisi in base al loro meccanismo di azione in inibitori della formazione del cancro; agenti bloccanti; agenti soppressori.

Tra gli agenti bloccanti, i modulatori degli enzimi del metabolismo degli xenobiotici e antiossidanti, sono considerati inibitori della fase di iniziazione. In questo contesto, diversi composti di origine vegetale hanno mostrato interessanti attività antitumorali. Tra i più efficaci vanno ricordati gli effetti antitumorali, e in generale salutari, degli ITC derivati dalle Brassicaceae, riportati in numerosi studi (Zhang 2012b, Fimognari *et al.* 2012).

La modulazione enzimatica, come strategia chemiopreventiva alimentare, nonostante gli eccellenti risultati sperimentali, risulta avere applicazioni limitate per l'uomo. Bisogna considerare, infatti che, oltre al metabolismo degli xenobiotici, il sistema del CYP450 è coinvolto in diverse funzioni cellulari, come il metabolismo degli steroidi, acidi grassi, leucotrieni, nell'omeostasi cellulare, e nell'apoptosi. Quindi, se da un lato una molecola esercita effetti chemiopreventivi, dall'altro può alterare l'equilibrio intracellulare e le funzioni endogene con conseguenze sulla salute. Inoltre, bisogna tenere presente che diverse isoforme possono rispondere in modo opposto all'esposizione ad una certa molecola, determinando un *pattern* enzimatico finale con risultati imprevedibili, sia dal punto di vista benefico che tossico (Paolini *et al.* 2003).

Da questo punto di vista le strategie preventive, basate sull'utilizzo di una singola molecola in grado di agire solamente su uno specifico enzima, potrebbero conferire una protezione nei confronti di uno specifico agente nocivo, ma nello stesso tempo aumentare le caratteristiche di tossicità di altre molecole con cui inevitabilmente si viene a contatto (Sapone *et al.* 2012). Per questi motivi, gli agenti capaci di indurre anche gli enzimi di fase II vengono, preferiti ai modulatori enzimatici strettamente selettivi per la fase I; inoltre si crede che i modulatori degli enzimi detossificanti possano inibire un numero maggiore di cancerogeni, e che i loro effetti abbiano ripercussioni potenziali meno dannose per la salute (Stoner *et al.* 1997).

Inoltre, anche gli agenti antiossidanti, in grado di reagire direttamente con le forme attive dei cancerogeni e i radicali liberi, come le specie reattive dell'ossigeno (ROS) capaci di effetti mutageni e cancerogeni, esercitano attività fondamentali dal punto di vista chemiopreventivo. Molti composti fitochimici, assunti con la dieta tramite alimenti vegetali, sono validi *scavenger* di molecole potenzialmente dannose, ed inoltre sono in grado di aumentare le difese antiossidanti e detossificanti tramite l'induzione enzimatica degli enzimi deputati a queste funzioni cellulari (Stan *et al.* 2008).

Nel capitolo successivo, le difese antiossidanti e il ruolo dello stress ossidativo nella patogenesi di alcune malattie, verrà trattato in modo più approfondito.

CAPITOLO 6

STRESS OSSIDATIVO ED AGENTI ANTIOSSIDANTI

6.1 INTRODUZIONE

I radicali liberi sono specie chimiche contenenti un elettrone spaiato nell'orbitale più esterno. Sono altamente instabili e reattivi, e tendono a reagire con altre molecole per sottrarre un elettrone col fine di raggiungere una maggior stabilità, innescando così un meccanismo radicalico a catena. I radicali liberi vengono generati dalla normale attività metabolica cellulare, e a concentrazione fisiologica, svolgono importantissime funzioni a livello cellulare e sistemico.

Esiste una grande varietà di specie reattive, le quali vengono classificate in base all'atomo su cui è centrato il radicale (ad esempio sull'ossigeno, sullo zolfo, sul carbonio, sull'azoto), o alla localizzazione dell'elettrone (Halliwell 2012).

6.2 FORMAZIONE DEI RADICALI

I radicali si formano in seguito ad accettazione o perdita di un elettrone, e in seguito alla scissione omolitica di un legame covalente: i due elettroni si separano simmetricamente formando due intermedi reattivi ciascuno dei quali possiede un elettrone spaiato. Tra i ROS vanno considerati: l'anione superossido ($O_2^{\bullet-}$), il perossido di idrogeno (H_2O_2) ed il radicale ossidrilico (HO^{\bullet}). La presenza di un elettrone in ambiente aerobico porta alla formazione, inizialmente del radicale superossido, del perossido di idrogeno ed infine del radicale ossidrilico. Il trasferimento monoelettronico porta alla formazione di un radicale catione e di un radicale anione, caratterizzati dall'aver, oltre ad un elettrone spaiato, anche una carica elettrica. Il primo passo, nella generazione dei ROS, è rappresentato dall'acquisizione da parte dell'ossigeno di energia sufficiente per raggiungere lo stato di singoletto e

dalla successiva acquisizione di un elettrone, dando origine così all'anione superossido ($O_2^{\bullet-}$). L'enzima superossido dismutasi (SOD), aggiungendo due protoni ed un elettrone, converte l'anione superossido in perossido di idrogeno (H_2O_2). $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 reagiscono tra loro determinando la formazione di una molecola di ossigeno, un anione ossidrilico, ed un radicale idrossilico (OH^{\bullet}) che tra i radicali dell'ossigeno, è la molecola più tossica e più pericolosa (Alfadda *et al.* 2012, Halliwell 2007).

Oltre ai radicali dell'ossigeno, esistono specie reattive centrate sull'azoto come per esempio l'ossido nitrico (NO^{\bullet}), il biossido nitrico (NO_2^{\bullet}), che come i ROS, in condizioni fisiologiche giocano ruoli di estrema importanza, ma che se prodotti in eccesso, possono essere causa di stress cellulare.

Come già accennato, i radicali liberi e altre specie reattive di tipo non radicalico vengono prodotti nei sistemi biologici, sia attraverso processi endogeni, che in seguito all'esposizione a sorgenti esogene.

Tra i processi fisiologici si annoverano per esempio:

- la respirazione aerobica mitocondriale in cui si ha la riduzione dell'ossigeno molecolare ad acqua mediante quattro processi ossido-riduttivi. I mitocondri rappresentano la fonte metabolica primaria di ROS, in cui i complessi enzimatici della catena respiratoria deputati alla fosforilazione ossidativa, trasferiscono elettroni all'ossigeno molecolare, in un processo che dovrebbe concludersi idealmente con la formazione di H_2O . Questo processo tuttavia non è perfetto, infatti, alcuni elettroni possono sfuggire alla catena respiratoria ed andare a ridurre direttamente molecole di ossigeno, generando così $O_2^{\bullet-}$, e/o H_2O_2 (Lenaz, 2001);

- la formazione di ROS a livello della membrana cellulare, per esempio da parte dell'attività degli enzimi NO sintasi (NOS). Nella membrana plasmatica dei leucociti polimorfonucleati, inoltre sono localizzati diversi enzimi, quali la NADPH ossidasi e le lipoossigenasi, che soprattutto in condizioni di una loro attivazione, come in seguito ad infezioni e

infiammazioni, portano alla formazione di specie reattive, e intermedi metabolici con caratteristiche di perossidi (Valko *et al.* 2007);

- l'attività dei perossisomi, costituisce un'altra importante fonte di produzione di ROS, producendo al loro interno H_2O_2 in seguito a processi di ossidazione, catalizzati da circa 50 enzimi ossidativi, utilizzando ossigeno molecolare. Una delle principali attività ossidative dei perossisomi è l'ossidazione degli acidi grassi a lunga catena (beta-ossidazione);

- la produzione di ROS a livello del REL è dovuta principalmente all'attività del sistema monoossigenasico citocromo P450-dipendente, in cui, in seguito al decadimento del complesso tra il CYP450 e l'ossigeno molecolare attivato, si possono formare specie reattive come $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 (Paolini *et al.* 2004b);

- il catabolismo dei nucleotidi purinici, principalmente ad opera dell'enzima xantina ossidasi può portare alla formazione di ulteriori ROS.

La produzione di ROS può avvenire inoltre ad opera di agenti esterni, sia chimici, fisici, che naturali. Tra questi, le radiazioni ionizzanti e i raggi UV. possono indurre il fenomeno della scissione omolitica o fotolisi dell'acqua con conseguente produzione di specie radicaliche (Valko *et al.* 2007). Fra gli agenti chimici, invece, l'ozono, i metalli, gli inquinanti ambientali come i PHA presenti per esempio nel fumo di sigaretta, e alcuni farmaci, sono in grado di indurre stress ossidativo. Inoltre un aumento di radicali, si può avere in seguito al consumo di alcuni cibi, soprattutto se cotti alla brace, e ricchi di grassi (Yazdanparast *et al.* 2008).

6.3 EFFETTI DEI RADICALI

A livello cellulare, le conseguenze dovute all'esposizione ai radicali liberi possono essere molteplici, e la loro gravità dipende dal tipo di

macromolecole con cui interagiscono. Esistono, infatti, strutture più “sensibili” rispetto ad altre, come per esempio la frazione lipidica delle membrane, le proteine e gli acidi nucleici.

L'esposizione alle specie radicaliche può indurre nei fosfolipidi delle membrane biologiche, un processo di perossidazione lipidica. Si tratta di una serie di reazioni a cascata che portano alla completa distruzione della membrana cellulare, che hanno inizio quando un radicale libero iniziatore cattura un atomo di idrogeno da un carbonio metilenico di un acido grasso polinsaturo. In seguito, si ha una ridistribuzione dei doppi legami, con formazione di un diene coniugato, il quale, reagendo con una molecola di ossigeno, produce un radicale perossile ($\text{ROO}\bullet$). Quest'ultimo a sua volta può reagire con una molecola di acido grasso polinsaturo formando un lipide idroperossido (ROOH) ed un nuovo radicale ($\text{R}\bullet$) (Figura 5.1). Queste alterazioni, a carico dei lipidi, si traducono in una riduzione della fluidità di membrana e di un aumento della permeabilità, con una conseguente perturbazione di tutte le strutture ad essa associate, e quindi della funzionalità dell'intera cellula. A seguito di un danno alla membrana cellulare, possono infatti derivare una serie di eventi avversi quali, l'attacco delle riserve endogene di GSH e di tioli, una modificazione delle concentrazioni ioniche intracellulari, un'alterazione della funzione delle proteine di membrana e delle funzioni mitocondriali, con conseguente danneggiamento di tutto il metabolismo energetico. Inoltre, durante la perossidazione lipidica si formano perossi-radicali reattivi in grado di raggiungere il torrente sanguigno e, quindi di iniziare un nuovo processo in altre sedi dell'organismo (Valko *et al.* 2007).

Per quanto riguarda le proteine, i radicali liberi promuovono l'ossidazione delle catene laterali degli amminoacidi, la formazione di legami crociati tra le proteine, e l'ossidazione della catena proteica provocandone la frammentazione. Queste alterazioni avvengono principalmente nei siti aromatici o in quelli contenenti zolfo. Inizialmente si ha l'estrazione di un idrogeno dalla proteina, a cui può seguire un processo di polimerizzazione,

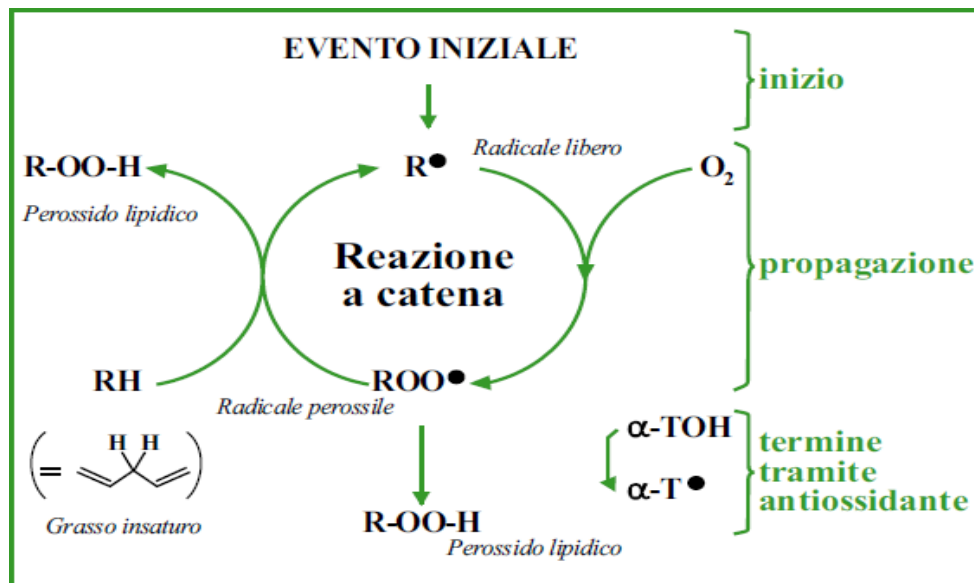
con formazione di ponti inter- o intra-molecolari che alterano la struttura secondaria della proteina, con conseguenti modificazioni funzionali.

L'attacco al DNA può provocare rotture a singolo o doppio filamento, modificazioni dello scheletro di deossiribosio, induzione di siti apurinici o apirimidinici, e danni ossidativi alle basi azotate. Questi eventi possono essere causa di un riarrangiamento cromosomico, *frame shifts*, scambio di cromatidi fratelli, arresto o induzione della trascrizione, errori replicativi ed instabilità genomica.

Oltre al DNA nucleare, anche il DNA mitocondriale risulta essere molto sensibile al danno ossidativo, in quanto ha ridotte capacità difensive e riparative.

Un ulteriore *target* dei ROS è rappresentato dalle *gap junctions*, che mediano il passaggio dei fattori di crescita, in grado di regolare la proliferazione cellulare.

Figura 5.1. Reazioni coinvolte nella perossidazione lipidica.



6.4 CONTROLLO DELLO STATO OSSIDOREDUTTIVO CELLULARE

Le specie ossidanti sono prodotti della normale attività metabolica che, a concentrazione fisiologica, svolgono importantissime funzioni a livello cellulare e sistemico. Negli organismi viventi un innalzamento dei livelli di ROS si può verificare in conseguenza dell'aumento dell'attività metabolica cellulare, ma anche da parte di agenti esterni.

La cellula contiene numerosi sistemi *redox*, tra cui i coenzimi deputati al trasporto di idrogeno come il NADPH, NADH, e riboflavine, le coppie substrato/prodotto come lattato/piruvato, acetaldeide/acido acetico, acido ascorbico/acido deidroascorbico, e il sistema glutatione e le proteine contenenti gruppi sulfidrilici. Lo stato ossidoreduztivo della cellula dipende sia dalla concentrazione, che dalla frazione relativa di coenzimi e substrati ridotti/ossidati.

In condizioni fisiologiche, le specie radicaliche sono sotto il controllo di sistemi di regolazione cellulare, che preservano lo stato ossidoreduztivo attraverso specifici agenti antiossidanti enzimatici e non, in grado di “spegnere” la catena di reazioni innescate dalle specie reattive, ripristinando l'equilibrio chimico cellulare grazie alla capacità di fornire ai radicali liberi gli elettroni di cui sono privi (Halliwell 2007).

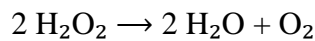
6.5 SISTEMI ANTIOSSIDANTI

Gli organismi viventi sono dotati di un complesso sistema di difesa contro lo stress ossidativo, costituito da agenti antiossidanti sia endogeni che esogeni, di natura enzimatica e non, con diverso meccanismo di azione e caratteristiche chimiche. Gli antiossidanti esplicano la loro azione contrastando o impedendo l'ossidazione di diverse molecole, prevenendo la formazione dei radicali, oppure cedendo a questi un elettrone. L'organismo umano possiede dei sistemi di difesa estremamente efficaci, come l'attività catalitica in grado di sequestrare direttamente o indirettamente i ROS,

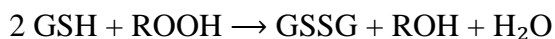
sostanze che funzionano da trappole chimiche nei confronti dei radicali liberi, e che ripristinano le difese antiossidanti. Tra questi vi sono gli enzimi antiossidanti che catalizzano la trasformazione o la distruzione di ROS, le molecole chelanti, e molecole in grado di agire da *scavenger*, come molte vitamine, il GSH, coenzimi e polifenoli.

Tra gli enzimi antiossidanti principali, presenti a livello citosolico, vi sono:

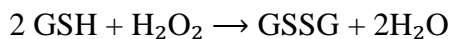
- la catalasi (CAT), localizzata principalmente nei perossisomi, e nella frazione citosolica, è un enzima capace di proteggere la cellula dagli effetti tossici del perossido di idrogeno (H_2O_2) catalizzando la sua decomposizione in ossigeno molecolare ed acqua, senza la produzione di radicali liberi, secondo la reazione seguente:



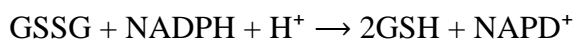
- la glutazione perossidasi (GSH-Px), un metallo-enzima contenente selenio che svolge la funzione antiossidante a livello intracellulare. Lo stress ossidativo produce perossidi che possono essere ridotti dal GSH tramite la glutazione perossidasi ad acqua ed alcool attraverso questa reazione:



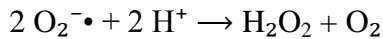
La glutazione perossidasi è, inoltre, in grado, ossidando il GSH, di convertire l' H_2O_2 a 2 molecole di acqua:



Il glutazione ossidato (GSSG) può essere poi ripristinato a GSH ad opera di un altro enzima, la glutazione reduttasi (GSSG-Red) NADPH-dipendente (Valko *et al.* 2007):

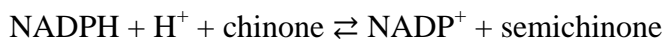


- La superossido dismutasi (SOD) è un metallo-enzima che catalizza la dismutazione dello ione superossido ad ossigeno molecolare e perossido di idrogeno (Valko *et al.* 2007), secondo la seguente reazione:



A pH fisiologico la velocità di dismutazione in presenza di SOD, è maggiore rispetto a quella non enzimatica, di circa 1000 volte.

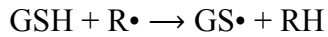
- La NADP(H): chinone ossidoreduttasi 1 (NQO1), considerato talvolta un enzima di fase II, è un enzima appartenente alla classe delle ossidoreduttasi, che catalizza la seguente reazione:



I chinoni sono un gruppo di substrati molto comuni, che possono avere effetti deleteri, come la capacità di arilare i nucleofili e generare specie reattive dell'ossigeno, che vengono ridotti con un meccanismo di trasferimento di ioni idruro per generare il corrispondente derivato idrochinonico. La NQO1 ha inoltre un importante ruolo nel metabolismo dei chinoni endogeni come la vitamina E e l'ubichinone. Per esempio la riduzione dell'ubichinone ad opera della NQO1 rigenera l'ubichinolo, che possiede forti proprietà antiossidanti (Landi *et al.* 1997), oppure la riduzione del chinone vitamina E, che si forma durante l'attacco del radicale libero alla vitamina E, può generare l'idrochinone corrispondente, con proprietà antiossidanti superiori alla vitamina E (Kohar *et al.* 1995).

Tra i sistemi antiossidanti endogeni non enzimatici il GSH, rappresenta il più importante antiossidante tiolico solubile all'interno della cellula. Il GSH esiste sia in forma ridotta che ossidata (GSSG), e partecipa alle reazioni redox attraverso l'ossidazione dei gruppi tiolici (Figura 5.2). Nelle normali condizioni cellulari si trova in forma ridotta, localizzata soprattutto nel

nucleo, nel REL e nei mitocondri. Il suo potere antiossidante deriva dalla capacità del gruppo -SH del residuo cisteinico di donare facilmente un elettrone:



Il ruolo protettivo del GSH deriva dal suo coinvolgimento in numerosi processi cellulari. È infatti cofattore di numerosi enzimi come la GSH-Px e la GST (Figura 5.3), e può inoltre agire da *scavenger* nei confronti di radicali come HO• e O₂•-, e di detossificare H₂O₂ e i perossidi lipidici. In aggiunta, è in grado di ripristinare anche la forma ridotta di importanti antiossidanti come la vitamina C ed E (Valko *et al.* 2006).

Figura 5.2. Struttura chimica della forma ridotta (GSH) ed ossidata (GSSG) del glutathione.

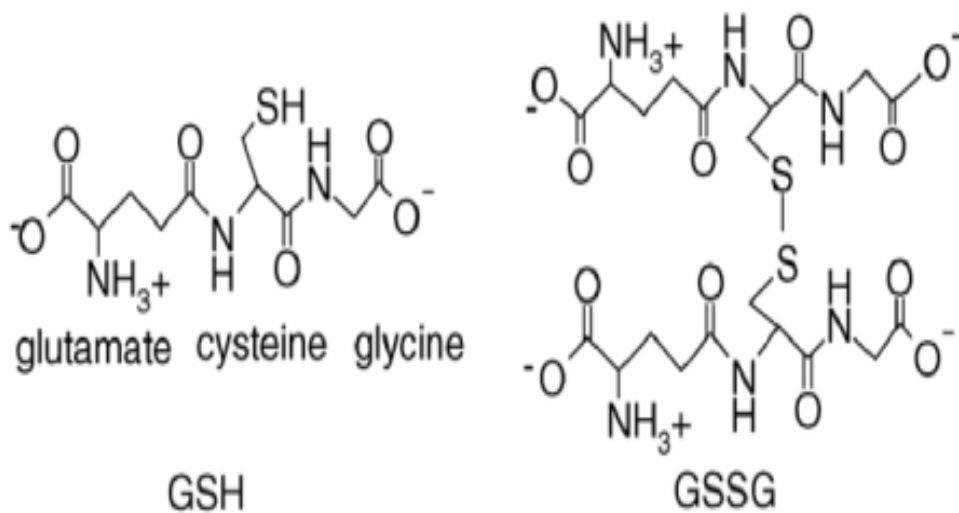
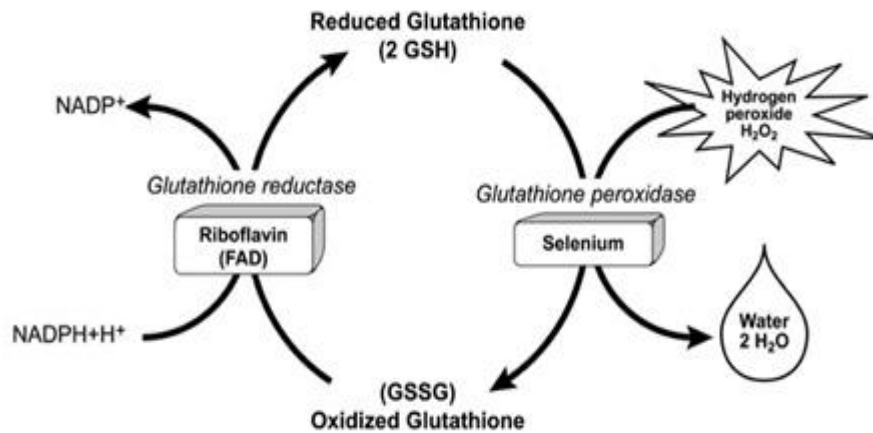


Figura 5.3. Ciclo di ossidazione-riduzione del glutatiene.



6.6 ANTIOSSIDANTI AD AZIONE INDIRECTA

La capacita di alcune molecole di indurre il sistema antiossidante e detossificante endogeno, rappresenta un meccanismo di protezione indiretto nei confronti dei danni cellulari derivanti dai radicali liberi, dai composti elettrofili, e da molecole tossiche (Nguyen *et al.* 2003, Talalay 1989).

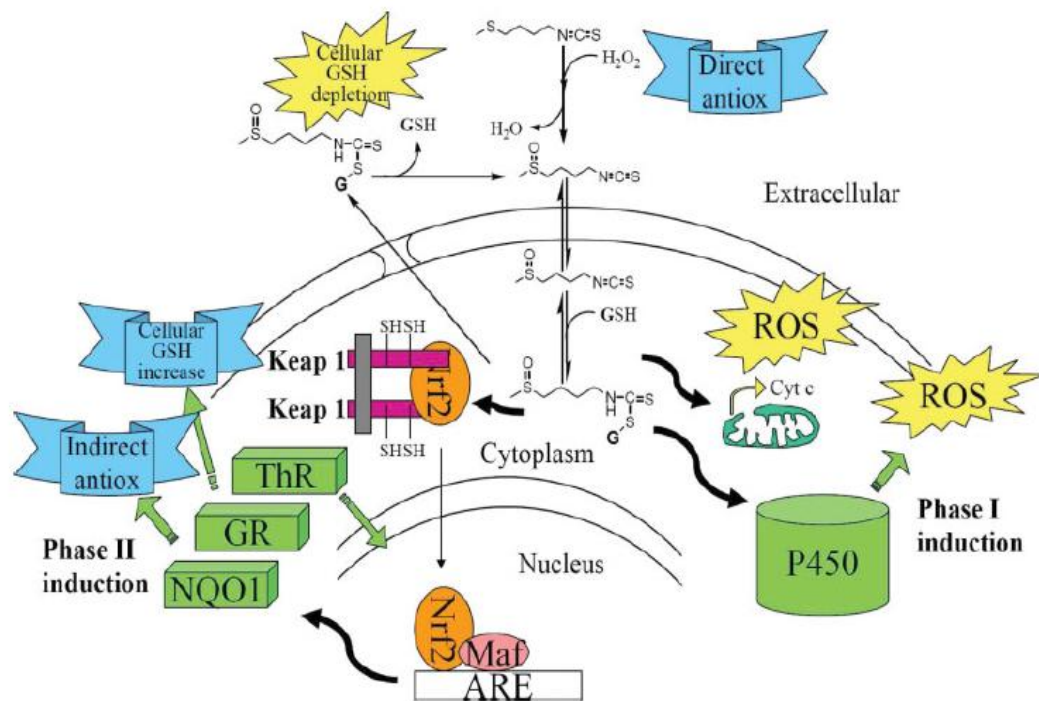
La cellula presenta un sistema di protezione contro lo *stress*, mediato da xenosensori, che convertendo i segnali extracellulari in risposte intracellulari, inducono a livello trascrizionale la produzione degli enzimi citoprotettivi ed un aumento della loro attivita catalitica.

Infatti, come è stato descritto precedentemente nel CAPITOLO 3, in seguito ad un aumento del livello dei ROS e di specie elettrofile, o ad una diminuzione di antiossidanti cellulari, come il GSH, viene attivata la trascrizione dei geni che presentano la sequenza ARE, da parte del fattore trascrizionale Nrf2. Questo *pathway* può essere inoltre attivato da alcune molecole naturali come i polifenoli, i flavonoidi, e i composti contenenti gruppi tiolici, come per esempio gli ITC. I composti in grado di attivare questa via di segnalazione hanno generalmente caratteristiche elettrofile, possono reagire con i gruppi sulfidrilici, possono partecipare a reazioni di

ossidazione, ed essere substrati della GST per la coniugazione con GSH (Dinkova-Kostova *et al.* 2002b, Talalay 1995).

Alla base dell'attività biologica protettiva delle molecole derivate dalla famiglia delle Brassicaceae, come ad esempio gli ITC, proprio la loro capacità proossidante, mediata principalmente dal consumo di GSH intracellulare, rappresenterebbe paradossalmente il fattore principale che provoca l'attivazione di questo sistema di protezione cellulare Nrf2 e ARE dipendente, che controlla le difese antiossidanti e detossificanti (Figura 5.4).

Figura 5.4. Meccanismo di azione antiossidante degli isotiocianati.



6.7 STRESS OSSIDATIVO E PATOLOGIE CORRELATE

Il termine stress ossidativo si riferisce all'insieme delle alterazioni che si producono nei tessuti, nelle cellule e nelle macromolecole biologiche, quando in seguito ad una alterazione dell'equilibrio intracellulare tra difese antiossidanti ed elementi proossidanti, si accumulano radicali reattivi.

La grande varietà di meccanismi che si possono attivare in conseguenza ad uno squilibrio *redox*, può contribuire in modo determinante allo sviluppo di numerose condizioni patologiche, in particolare, tumori, patologie a base infiammatoria, diabete, ischemia, malattie cardiovascolari e neurodegenerative. Tuttavia, non è ancora chiaro se lo stress ossidativo sia tra le cause originarie, o tra gli eventi che si manifestano durante il processo patologico e che contribuiscono alla progressione della malattia.

Per esempio, nel caso del danno da ischemia-riperfusion, è stato dimostrato che lo stress ossidativo è in diretto rapporto con l'aumento della concentrazione di calcio citosolico, ed in questo caso rappresenta essenzialmente un valore di biomarcatore del processo patologico in corso. Anche nel morbo di Parkinson è poco probabile che lo stress ossidativo sia l'evento primario, iniziale, del processo degenerativo che porta alla deplezione dei neuroni dopaminergici, ma è certo comunque che nel corso della malattia si verificano fenomeni ossidativi che partecipano in modo sostanziale alla progressione del danno neuronale.

I ROS inoltre, sembrano essere coinvolti in molti processi infiammatori, che caratterizzano per esempio diverse patologie tipiche dell'invecchiamento.

La presenza di alti livelli di ROS e in particolare di perossido di idrogeno, nelle cellule tumorali ha portato alla definizione del concetto di "stato di stress ossidativo persistente" del cancro (Loo 2003). Lo stress ossidativo, provocando una deplezione delle riserve di GSH, stimola una costante attivazione dei fattori di trascrizione *redox*-sensibili MAP chinasi dipendenti, come NF- κ B, AP1 e c-myc, e dei geni di risposta che promuovono la vitalità e la proliferazione cellulare.

Nella condizione di iperlipidemia inoltre, spesso associata a iperglicemia ed obesità, causata generalmente da un'alimentazione ricca di grassi, è stata osservata una forte componente di stress ossidativo, dovuta prevalentemente alla perossidazione lipidica, aggravata da un indebolimento delle difese antiossidanti e del sistema metabolico di detossificazione (Odermatt 2011, Matsuzawa-Nagata *et al.* 2008). Una dieta ricca di grassi è considerata un fattore di rischio primario per le malattie cardiovascolari, tumori, alterazioni

del metabolismo e delle funzioni endocrine. In presenza di un eccesso di lipidi, infatti, si verifica un'attivazione della lipolisi e della produzione di acidi grassi liberi, tramite l'attivazione dei recettori beta-adrenergici, che provoca un disaccoppiamento della fosforilazione mitocondriale, con conseguente sovrapproduzione di ROS. Inoltre, un'alterazione della catena respiratoria mitocondriale, può portare ad un'ossidazione degli acidi grassi liberi a livello dei perossisomi da parte dell'enzima acil-CoA ossidasi, e nel reticolo endoplasmatico da parte del CYP2E1, con ulteriore formazione di radicali reattivi (Matsuzawa-Nagata *et al.* 2008, Bhandari *et al.* 2011).

In queste condizioni sopraelencate, risulta tuttavia complicato stabilire se lo stress ossidativo sia la causa iniziale dei fenomeni, e quanto esso partecipi ai meccanismi patogenetici del danno. Potrebbe essere pertanto errato considerare lo stress ossidativo come l'origine di tutti i processi patologici nei quali si manifesta, mentre sembra più ragionevole considerarlo come un evento determinante che accompagna la progressione della patologia, sul quale sia possibile agire per interrompere e limitarne gli effetti dannosi, per esempio tramite l'assunzione di agenti antiossidanti tramite la dieta (Corti *et al.* 2009).

La capacità di alcuni prodotti naturali di prevenire o di ritardare queste condizioni, ha stimolato l'interesse per la ricerca di agenti antiossidanti e ipolipidemizzanti contenuti soprattutto in frutta e verdura. I *phytochemicals*, come ad esempio i polifenoli, i terpenoidi, e gli organosolfuri, sono stati descritti come i principali responsabili degli effetti salutari associati ad una dieta ricca di vegetali, grazie ai loro effetti antiossidanti, anticarcinogenici, e antiinfiammatori (González-Castejón *et al.* 2011).

CAPITOLO 7

ATTIVITÀ BIOLOGICA DELLE BRASSICACEAE: EFFETTI BENEFICI E TOSSICI

7.1 INTRODUZIONE

Il consumo di vegetali appartenenti alla famiglia delle Brassicaceae, e dei loro derivati, è stato associato ad importanti effetti salutari in numerosi studi scientifici. Generalmente queste proprietà, vengono attribuite quasi esclusivamente alla capacità dei prodotti di idrolisi dei GLS, gli ITC, di indurre il potenziale antiossidante e detossificante delle cellule e dei tessuti. Bisogna però considerare che questi vegetali contengano una moltitudine di GLS con varie proprietà chimiche, e che in seguito a differenti vie di degradazione possono dare origine ad un ampio spettro di prodotti strutturalmente e funzionalmente diversi tra loro. Inoltre alcuni fattori chimici, fisici e biologici possono interferire con queste reazioni, rendendo difficile prevedere con certezza la natura e la quantità dei prodotti bioattivi finali che ne derivano e la loro biodisponibilità.

Dai numerosi lavori presenti in letteratura, in cui viene studiato per esempio *in vivo* l'effetto di un vegetale *in toto*, di un estratto, o di una molecola pura, emergono inoltre risultati non sempre concordanti, dai quali non è possibile identificare con chiarezza i principali composti responsabili degli effetti osservati. Sembra pertanto riduttivo attribuire unicamente ad una singola classe di molecole, come gli ITC, le proprietà di un intero vegetale contenente invece una miriade di molecole che possono interagire sinergicamente tra di loro per dare un effetto finale. A tale proposito alcuni studi hanno messo in evidenza che l'insieme dei *phytochemicals* presenti in un vegetale intero conferirebbe maggiore protezione rispetto a singole classi di molecole, con un'ulteriore riduzione del potenziale rischio tossicologico. In aggiunta, sono stati pubblicati recentemente alcuni lavori che descrivono per esempio una presunta attività biologica diretta di alcuni GLS intatti nel

modulare gli enzimi di fase I e II (Abdull Razis *et al.*2010, Heinen *et al.* 2012).

In generale gli effetti salutari delle Brassicaceae si esplicano principalmente tramite l'induzione degli enzimi antiossidanti e detossificanti di fase II, l'inibizione degli enzimi bioattivanti di fase I, l'attività antiinfiammatoria, la capacità di regolare il ciclo cellulare e di indurre l'apoptosi in cellule tumorali. D'altro canto però, fenomeni di tossicità sono emersi in seguito all'esposizione ad alti dosaggi, soprattutto di singole molecole, principalmente attraverso la perturbazione delle isoforme di CYP450, la generazione di stress ossidativo ed eventi genotossici (Fimognari *et al.* 2012).

7.2 ATTIVITÀ CHEMIOPREVENTIVA

Numerosi studi epidemiologici supportano il ruolo delle Brassicaceae nella prevenzione di diversi tumori, come per esempio quello del polmone, del colon-retto, della prostata, e dello stomaco. È stato osservato che la somministrazione orale di ITC è in grado di prevenire il processo di cancerogenesi in modelli animali, sia con predisposizione genetica che indotto dall'esposizione a noti cancerogeni. Inoltre, gli ITC, ed in particolare il SFN, possono inibire la crescita di cellule tumorali umane in diversi modelli animali *xenograft*, ed aumentare l'attività antitumorale di alcuni farmaci (Dinkova-Kostova *et al.* 2012). È largamente riconosciuto che l'attività biologica di queste molecole naturali si esplica tramite una moltitudine di meccanismi di azione, tra cui: la modulazione del metabolismo dei cancerogeni, principalmente attraverso l'inibizione del sistema enzimatico CYP450 dipendente, la modulazione del ciclo cellulare, l'inibizione dell'angiogenesi e della metastasi, effetti antiossidanti, antiinfiammatori, e immunomodulatori (Holst *et al.* 2004).

Storicamente, Paul Talalay *et al.* studiando gli estratti di broccolo, sono stati i primi ad identificare la capacità degli ITC di inibire gli enzimi di fase I e di

indurre quelli di fase II, in modo da diminuire i livelli di mutageni e cancerogeni nell'organismo, ed il SFN fu isolato come il principale composto attivo (Talalay *et al.* 1978, Zhang *et al.* 1992). Successivamente, è stata osservata un'induzione di proteine citoprotettive anche in seguito a trattamenti con altri ITC in vari organi come fegato, polmoni, reni, vescica, e intestino. Nell'uomo, in seguito alla somministrazione di estratti di germogli di broccoli è stato osservato un aumento della trascrizione degli enzimi Nrf2 dipendenti, come GST e NQO1, in modo dose dipendente, principalmente nelle vie respiratorie (Riedl *et al.* 2009) e nelle cellule del sangue (Harvey *et al.* 2011). Questi effetti protettivi si sono dimostrati inoltre duraturi nel tempo, fino ad alcuni giorni, in accordo con l'emivita dei fattori proteici attivati, anche in seguito ad unica somministrazione (Dinkova-Kostova *et al.* 2007).

Analisi di espressione genica globale hanno confermato che la maggior parte dei geni che codificano per enzimi ad attività preventiva hanno una comune regolazione trascrizionale attraverso il *pathway* Keap1–Nrf2–ARE dipendente (Thimmulappa *et al.* 2002).

È stata inoltre osservata la capacità degli ITC di indurre l'arresto del ciclo cellulare e dell'apoptosi in cellule tumorali, principalmente con un meccanismo dipendente dalla c-Jun N-terminale chinasi (JNK). Altri eventi correlati al processo di cancerogenesi, che possono essere influenzati da molecole presenti nelle Brassicaceae sono l'inibizione del fattore di crescita dell'endotelio vascolare, e la riduzione dell'espressione di citochine proinfiammatorie come IL-1B, TNF α , IL-6 in cellule tumorali. Il SFN per esempio è in grado di inibire l'attivazione del fattore di trascrizione NF κ b, l'espressione genica di mediatori proinfiammatori, e di ridurre il numero di macrofagi attivi in diversi modelli animali (Dinkova-Kostova *et al.* 2012).

Sono stati osservati anche effetti antiestrogenici da parte di estratti di Brassicaceae dovuti principalmente alla presenza di composti indolici, come I3C e DIM, in grado, a basse dosi, di contrastare l'insorgenza del tumore alla mammella, modulando l'attività dei recettori per gli estrogeni (Stoner *et al.* 2002).

7.3 PREVENZIONE DI MALATTIE CARDIOVASCOLARI

Le malattie cardiovascolari rappresentano attualmente la prima causa di morte al mondo, e lo studio della loro prevenzione su ampia scala, soprattutto tramite la diminuzione dei fattori di rischio, rappresenta pertanto una priorità assoluta. L'ipertensione, l'iperlipidemia, una dieta iperlipidica, il fumo e l'obesità, rappresentano i fattori di rischio principalmente identificati per le malattie cardiovascolari. Poiché lo stress ossidativo è associato con tutti questi fattori, ed è inoltre coinvolto nel processo di formazione di placche aterosclerotiche, la prevenzione dei disordini cardiovascolari potrebbe essere potenzialmente raggiunta contrastando la formazione di ROS (Drummond *et al.* 2010).

In ratti alimentati con germogli di broccoli è stata per esempio osservata una diminuzione dello stress ossidativo del tessuto cardiovascolare e una diminuzione della pressione arteriosa. Inoltre in un modello animale di ischemia/riperfusion, l'assunzione di un estratto di broccoli migliorava le funzioni ventricolari postischemiche, e riduceva la dimensione della zona infartuata del miocardio, insieme all'apoptosi dei cardiomiociti (Mukherjee *et al.* 2008).

Se da una parte, una dieta sbilanciata, soprattutto ricca di grassi, sembra avere un ruolo deleterio nell'influenzare negativamente tutti i fattori coinvolti nella patogenesi delle malattie cardiovascolari, dall'altra un'alimentazione controllata e bilanciata, rappresenta una delle strategie più efficaci per contrastare la loro insorgenza. Una dieta ricca di vegetali, infatti, è stata associata ad un miglioramento dell'iperlipidemia e del peso corporeo, grazie all'inibizione della crescita del tessuto adiposo e della differenziazione dei preadipociti, la stimolazione della lipolisi e l'induzione dell'apoptosi degli adipociti esistenti (Asdaq *et al.* 2010, Gonzalez-Castejon *et al.* 2011). Recentemente, in un modello animale di ipercolesterolemia, indotto con la dieta, l'assunzione di un estratto di germogli di broccoli ricco di GRA, si è dimostrata efficace nel ridurre i livelli di colesterolo, accompagnata ad una deregolazione dell'espressione genica dei fattori

coinvolti nel controllo dell'omeostasi lipidica come, le *sterol regulatory element-binding proteins* e l'acido grasso sintetasi (Rodriguez-Cantu *et al.* 2011). In uno studio clinico inoltre, il consumo di germogli di broccoli per una settimana riduceva i valori di LDL e colesterolo, in soggetti sani (Murashima *et al.* 2004). Un altro lavoro, che indagava gli effetti di un estratto di crescione d'acqua in ratti ipercolesterolemici, ha suggerito che l'attività ipolipemizzante osservata, poteva essere attribuita al potenziale antiossidante di questo vegetale appartenente alla famiglia delle Brassicaceae. Il trattamento dei ratti ipercolesterolemici con l'estratto aumentava infatti significativamente i livelli di GSH, l'attività della CAT e SOD, e diminuiva i *marker* di perossidazione lipidica considerati (Yazdanparast *et al.* 2008).

Nell'insieme, non è ancora chiaro se questi effetti protettivi delle Brassicaceae, nei confronti delle alterazioni provocate da una dieta ricca di grassi, ed in generale, delle malattie cardiovascolari, siano dovuti ad una specifica classe di molecole (es. GLS o ITC), oppure all'interazione sinergica di migliaia di composti all'interno del vegetale intero. E' interessante notare che in uno studio recente, le proprietà ipocolesterolemiche di un estratto di germogli di broccoli, si sono dimostrate più efficaci rispetto a quelle delle singole molecole in esso contenuti, come SFN. La combinazione di un insieme di *phytochemicals* potrebbe, quindi tramite un'attività sinergica, aumentare la loro biodisponibilità e la loro azione su più bersagli molecolari contemporaneamente, offrendo così maggiori vantaggi rispetto al consumo di sostanze singole (Rodriguez-Cantu *et al.* 2011).

7.4 PROTEZIONE DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE

Come nel processo di cancerogenesi e nelle malattie cardiovascolari, lo stress ossidativo e l'infiammazione cronica sono elementi centrali nella patogenesi delle malattie del sistema nervoso centrale, e gli effetti protettivi

degli ITC sono stati osservati in diverse situazioni di danno tissutale del sistema nervoso e in episodi di neurodegenerazione.

L'azione protettiva del SFN è stata osservata in modelli animali di ischemia/riperfusionazione del cervello, di trauma cerebrale, di emorragia cerebrale, e di lesioni al midollo spinale, dove la somministrazione di SFN era in grado di ridurre l'area infartuata, l'edema del cervello o del midollo spinale, l'apoptosi corticale, di preservare le funzioni della barriera ematoencefalica, e di diminuire la presenza di *deficits* neurologici. In un modello di Parkinson murino, il SFN proteggeva i neuroni dopaminergici dalla morte cellulare, riduceva l'astroglia, la microglia, il rilascio di mediatori proinfiammatori nei gangli basali, e lo stress ossidativo (Zhao *et al.* 2005, Wang *et al.* 2012). Inoltre gli ITC, attraverso l'induzione del macchinario detossificante cellulare, mediata dall'attivazione del fattore di trascrizione Nrf2, determinano un'accelerazione del metabolismo e dell'eliminazione delle neurotossine, giocando così un ruolo chiave nella prevenzione della neurodegenerazione (Toyama *et al.* 2011). Tra i geni *target* di Nrf2, le subunità del proteosoma possono rappresentare un'altra componente importante attraverso cui si esplica l'attività neuroprotettiva degli ITC. Infatti, l'accumulo di proteine o peptidi alterati, è un *marker* comune delle malattie neurodegenerative, come per esempio l'accumulo del peptide beta-amiloide nel cervello considerato una delle principali cause del morbo di Alzheimer (Park *et al.* 2009).

7.5 ULTERIORI EFFETTI PROTETTIVI

Differenti studi hanno evidenziato inoltre le capacità preventiva degli ITC nei confronti di altre condizioni come il diabete, le infezioni da *Helicobacter pylori*, malattie osteo-articolari, la steatosi epatica, e di molti altre patologie con una forte componente di stress ossidativo (Dinkova-Kostova *et al.* 2012).

7.6 EFFETTI TOSSICI

Considerando le numerose proprietà benefiche sopra elencate delle Brassicaceae e delle molecole in esse contenute, non sorprende il fatto che il loro consumo sia largamente diffuso, soprattutto sottoforma di integratori alimentari. Oltre alle osservazioni degli effetti salutari, che derivano principalmente dagli studi su animali, sono state però evidenziate anche alcune proprietà tossiche di questi vegetali, che tuttavia vengono spesso ignorate nei confronti dell'uomo.

A causa di questa duplice attività, da un lato protettiva per la salute e dall'altro tossica, specialmente nel caso di un'assunzione prolungata e ad alti dosaggi di molecole singole, una valutazione accurata del loro profilo tossicologico dovrebbe essere fornito prima di un loro utilizzo su larga scala nella popolazione. Infatti, considerando che è in continuo aumento la diffusione di integratori e supplementi naturali alimentari, contenenti dosi estremamente elevate di molecole ritenute benefiche come SFN, I3C o DIM, e che l'utilizzo di questi prodotti non è generalmente controllato dalle autorità governative, una loro caratterizzazione e regolazione risulta necessaria. Inoltre è da sottolineare la nuova tendenza tra i produttori di sviluppare i cosiddetti "supervegetali", contenenti aumentati livelli di molecole "salutari", come per esempio il Super Broccolo, con un livello di GRA aumentato fino a quattro volte.

Anche se non è ancora del tutto chiaro quale concentrazione possa essere raggiunta nei tessuti umani in seguito al consumo di questi prodotti, alcuni studi hanno osservato che possono essere anche raggiunte concentrazioni micro- e milli-molari nel plasma e negli epatociti, rispettivamente, che risultano in parte sovrapponibili con quelle che hanno mostrato effetti (geno)tossici negli esperimenti *in vitro* ed *in vivo* (Zhang 2004, Fimognari *et al.* 2011).

Basandosi solamente sulle conoscenze correnti, risulta quindi rischioso, da un punto di vista tossicologico, somministrare a scopo sia preventive che terapeutico, elevate dosi di ITC all'uomo, dal momento che non è stata

ancora dimostrata clinicamente una relazione dose effetto, e la biodisponibilità tissutale è largamente sconosciuta.

Originariamente i GLS sono stati infatti studiati principalmente per i loro effetti potenzialmente antinutrizionali e tossici, e venivano conseguentemente rimossi dalle fonti alimentari e nei mangimi animali. Alla luce delle nuove evidenze che hanno dimostrato importanti effetti antitumorali e benefici, le proprietà biologiche dei GLS e degli ITC sono state così rivalutate. È da considerare il fatto però, che non tutti i GLS presentano un'attività potenzialmente tossica, e che gli effetti salutari osservati a concentrazioni alimentari, non necessariamente aumentano al crescere della dose. A dosaggi moderati, infatti, come quelli derivanti dal consumo di vegetali, si ha una stimolazione delle strutture e dei meccanismi protettivi cellulari coinvolti nell'omeostasi, aumentando i dosaggi, invece, si possono presentare eventi avversi, come effetti apoptotici, citotossici, cancerogeni e genotossici (Holst *et al.* 2004, Fimognari *et al.* 2011).

La somministrazione di ITC può provocare per esempio un'alterazione della morfologia e della funzione di diverse cellule e organi, come disfunzioni renali e tossicità alla tiroide, come mostrato in alcuni studi animali. Oltre a questi, il fegato risulta uno degli organi principalmente colpiti: la somministrazione di DIM per 4 settimane a cani Beagles provocava un aumento della bilirubina, e dei valori di ALT, AST e ALKP nel siero, accompagnate da lesioni istopatologiche nel fegato, suggerendo così, un danno epatocellulare e colestasi. In altri studi su roditori, in seguito alla somministrazione di I3C, il fegato veniva identificato come uno dei principali organi bersaglio di cui si osservava un aumento del peso, alterazioni istopatologiche, ipertrofia centrolobulare, ed aree di necrosi diffuse (Krishnaraj *et al.* 2004, Leibel *et al.* 2003, Crowell *et al.* 2006).

Effetti genotossici diretti sono stati inoltre osservati in diversi esperimenti *in vitro*: per esempio l'esposizione di diversi tipi di cellule ad ITC allilici o a succhi crudi di alcune Brassicaceae, causava rotture e formazione di addotti al DNA, dovute presumibilmente alla formazione di ROS. Altri effetti genotossici osservati in diversi studi dovuti all'esposizione ad ITC,

includono per esempio l'induzione di aberrazioni cromosomiche, di micronuclei, di mutazioni puntiformi, e di rotture al DNA (Fimognari *et al.* 2011). I meccanismi attraverso cui gli ITC esplicano genotossicità, possono essere numerosi e complessi. Gli ITC, essendo molecole elettrofile, sono in grado di formare addotti col DNA, ed inoltre di agire come proossidanti provocando un'ingente riduzione del *pool* cellulare di antiossidanti, come i composti tiolici. I coniugati GSH-ITC vengono infatti esportati fuori dalla cellula rapidamente dove vengono dissociati, e gli ITC sono liberi di rientrare all'interno della cellula dove subiscono un'ulteriore coniugazione, grazie all'attività catalitica dell'enzima GST, stabilendo un circolo che rapidamente porta alla deplezione di GSH cellulare. (Valgimigli *et al.* 2009). Oltre al consumo di composti tiolici, gli ITC possono aumentare lo stress ossidativo cellulare tramite diversi meccanismi. Per esempio, è stato riportato che il gruppo funzionale $-N=C=S$ di alcuni ITC, può subire una reazione redox con Cu(I) e il perossido di idrogeno, portando alla formazione di perossidi e conseguente danno al DNA (Murata *et al.* 2000). Danni a livello mitocondriale possono inoltre contribuire alla produzione di ROS e alla generazione di stress ossidativo. In numerosi studi è stato osservato un danno ai mitocondri in seguito ad esposizione con ITC, come l'alterazione del potenziale di membrana, inibizione della catena respiratoria, e rilascio di citocromo c (Fimognari *et al.* 2011).

Gli ITC sono anche potenti modulatori del sistema CYP450 dipendente, in grado di provocare un complesso *pattern* di attivazione ed inibizione cinetica di molti enzimi, con una conseguente profonda influenza sul metabolismo degli xenobiotici e sulla generazione di ROS. Come riportato in alcuni lavori, il trattamento di ratti con GRA provocava una forte induzione delle isoforme di CYP40, linearmente correlata con la produzione di ROS, sia a livello epatico che polmonare (Paolini *et al.* 2004b, Perocco *et al.* 2006). In aggiunta, considerando che questo sistema enzimatico è coinvolto sia nel metabolismo di substrati endogeni, che di molecole precancerogene e pretossiche, ogni sua perturbazione può rappresentare un potenziale rischio tossicologico. È importante inoltre ricordare che possono

manifestarsi reazioni avverse e rischiose interazioni farmacologiche in seguito a modulazione delle isoforme responsabili del metabolismo dei farmaci.

Tramite gli effetti genotossici diretti o attraverso meccanismi epigenetici, che coinvolgono per esempio la perturbazione del sistema enzimatico CYP450 dipendente, gli ITC possono in aggiunta esercitare effetti (co)cancerogeni. È stato osservato infatti, che alcuni ITC, soprattutto quelli con struttura indolica, possono esercitare un'attività promuovente la cancerogenesi. Alcuni studi descrivono per esempio una promozione di tumori epatici da parte di I3C e DIM in pesci e roditori, dovuti principalmente a meccanismi estrogenici.

Molti dei composti contenuti nelle Brassicaceae, sono inoltre agonisti del recettore AhR, che a sua volta controlla l'espressione di numerosi geni tra cui CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, UDPGT, e GST.

È interessante notare che gli effetti tossici, come la promozione di tumori, della teratogenesi, delle alterazioni delle funzioni endocrine, e della tossicità epatica, provocati da composti diossina-simili, tra cui per esempio il benzo(a)pirene (BaP), siano mediati principalmente dall'attivazione del *pathway* AhR dipendente. Di conseguenza, qualsiasi agonista del recettore AhR potrebbe essere potenzialmente in grado di indurre un simile rischio tossicologico; a questo proposito, molti dei *phytochemicals* noti per l'attività antitumorale come SFN, I3C e DIM, sono tutti agonisti di questo recettore, e potrebbero perciò provocare rischiose conseguenze per la salute tramite una forte alterazione dell'espressione genica AhR-dipendente in cellule suscettibili (Bradshaw *et al.* 2009).

CAPITOLO 8

SCOPO DELLA TESI

Numerosi studi *in vivo* ed epidemiologici riportano un'attività preventiva nei confronti di numerose patologie da parte delle Brassicaceae e delle loro molecole derivate, che si esplica attraverso molteplici effetti biologici che coinvolgono la modulazione di diverse vie di segnalazione.

Negli ultimi anni sono stati compiuti grandi sforzi per cercare di identificare i principali componenti bioattivi di questi vegetali, e attualmente, viene ritenuto che i metaboliti secondari, gli ITC, siano i principali responsabili degli effetti benefici, mentre i loro precursori GLS sarebbero essenzialmente inerti. Il destino metabolico dei GLS intatti e del loro potenziale ruolo biologico non è stato però ancora completamente chiarito. La reazione di idrolisi dei GLS può essere influenzata, infatti, da diversi fattori fisico-chimici che possono compromettere la biodisponibilità finale e l'effetto previsto degli ITC. Inoltre, dai numerosi studi presenti in letteratura, in cui vengono indagati per esempio gli effetti dell'assunzione orale di un vegetale intero, di un estratto, o di molecole singole, non è possibile identificare con chiarezza quale sia la classe di composti maggiormente responsabile degli effetti osservati, a causa dei molteplici fattori che possono influire sul metabolismo e sulla trasformazione di queste molecole.

Alcuni studi hanno riportato che i GLS, come la GRA per esempio, possono essere assorbiti intatti attraverso l'epitelio intestinale dopo l'assunzione orale, e raggiungere così la circolazione sanguigna nonostante la loro idrofilità. In aggiunta, un effetto biologico diretto dei GLS intatti, GRA e GER, nel modulare il metabolismo degli xenobiotici, è stato recentemente descritto in sezioni di fegato e polmone di ratto (Abdull Razis *et al.* 2010, Abdull Razis *et al.* 2011a).

Nelle preparazioni commerciali di estratti di Brassicaceae o negli integratori a base di singole molecole, in cui la MYR viene generalmente inattivata durante i processi di preparazione, la conversione ad ITC può avvenire solo

da parte della MYR intestinale, che tuttavia ha una bassa efficienza, e non permette la conversione completa di tutti i GLS. Un modo per superare questa difficoltà, potrebbe quindi essere quella di accompagnare il consumo di un prodotto a base di GLS con una fonte di MYR esterna, con il fine di aumentarne la conversione ad ITC.

L'obiettivo di una parte di questo lavoro è stata proprio quella di distinguere se gli effetti delle Brassicaceae siano dovuti principalmente ai GLS intatti, agli ITC convertiti dalla MYR intestinale o esogena, oppure ad entrambi, nel contesto di altre molecole presenti nel vegetale *in toto*. In questi termini, la presenza di una fonte di MYR esogena, è stata considerata come un potenziale stratagemma per aumentare gli effetti salutari e chemiopreventivi. A questo scopo, è stato studiato l'effetto della somministrazione di un estratto di germogli di *Brassica oleracea* L. var. *acephala* subvar. *Laciniata* L. (una varietà di kale, conosciuta comunemente come cavolo nero toscano) (TBCSE) sugli enzimi del metabolismo degli xenobiotici, e sugli enzimi antiossidanti, nel fegato di ratto, con e senza "biottivazione" da parte di MYR esogena.

Un'ulteriore parte del lavoro è stata dedicata allo studio degli effetti protettivi del medesimo estratto nei confronti delle alterazioni provocate da una dieta ricca di grassi. La condizione di iperlipidemia è stata recentemente associata ad un aumento dello stress ossidativo e ad un decremento delle capacità antiossidanti e detossificanti dell'organismo, risultante in un'eliminazione inefficace dei radicali liberi e tossici, con un conseguente potenziale danneggiamento delle componenti cellulari. L'abilità di alcune sostanze naturali di ritardare e prevenire queste condizioni ha incrementato l'interesse nella ricerca di agenti ipolipemizzanti e antiossidanti contenuti in frutta e verdura (Asdaq *et al.* 2009; González-Castejón *et al.* 2011). Alcune Brassicaceae, grazie al loro contenuto di molecole biologicamente attive in grado di stimolare gli enzimi citoprotettivi, sembrano avere un'azione antiossidante ed ipolipidemizzante in grado di migliorare le condizioni di iperlipidemia, rappresentando così una fonte di protezione nei confronti di tutte le condizioni patologiche che ne derivano. In questa parte

sperimentale, è stato quindi investigato l'effetto di TBCSE sugli enzimi antiossidanti e detossificanti di fase II nel fegato di ratti alimentati con una dieta iperlipidica. Inoltre è stata valutata la capacità dell'estratto di influenzare i valori lipidici ematici, e di ridurre il peso corporeo. Anche in questo caso, l'estratto è stato in alcuni casi "predigerito" con MYR esogena, prima della somministrazione, col fine di migliorare la biodisponibilità degli ITC.

Se da una parte, le Brassicaceae esercitano effetti antitumorali ed in generale protettivi sulla salute, dall'altra, alcune molecole in esse contenute, se assunte per periodi prolungati e a dosi elevate possono contrariamente provocare eventi avversi, che vanno da fenomeni di tossicità fino a veri e propri effetti cancerogeni. Ciononostante, la letteratura scientifica basandosi quasi esclusivamente sugli effetti benefici osservati, ha stimolato un aumento dello sviluppo di strategie alimentari per la protezione della salute umana, con una conseguente ampia ed incontrollata diffusione sul mercato di integratori alimentari e cibi funzionali, contenenti pericolose quantità di molecole biologicamente attive. Non può essere, infatti, escluso con certezza un rischio tossicologico associato all'assunzione di elevati dosaggi di GLS o ITC, considerando soprattutto alcune osservazioni, seppur ancora limitate, sui loro potenziali effetti nocivi. Una valutazione accurata e approfondita, e lo studio del profilo tossicologico di questo tipo di prodotti risulta quindi essere necessaria prima del loro utilizzo nella pratica clinica o della diffusione su larga scala.

Lo scopo di una parte della tesi, svolto durante un periodo di ricerca presso il *The Leibniz Research Centre for Working Environment and Human Factors* (IfADo) a Dortmund in Germania, è stato quello di studiare il profilo di espressione multi genica, tramite *microarrays*, la citotossicità e la generazione di stress ossidativo, in epatociti primari di ratto, esposti ad alcuni *phytochemicals* derivati dalle Brassicaceae (GRA, SFN, DIM e I3C). Inoltre, considerando l'abilità di questi composti di attivare il *pathway* molecolare AhR-dipendente, è stato effettuato un confronto con il profilo di espressione genica ottenuto in seguito all'esposizione ad un noto e potente

agonista del recettore AhR, il BaP, con lo scopo di identificare possibili meccanismi comuni alla base della loro azione tossica.

CAPITOLO 9

MATERIALI E METODI

9.1 PREPARAZIONE DELL'ESTRATTO

Grazie alla collaborazione con il Dott. Renato Iori, del Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura - Centro di Ricerca per le Colture Industriali di Bologna (CRA-CIN), è stato preparato un estratto idroalcolico di germogli di sei giorni, di *Brassica oleracea* L. var. *acephala* (DC) subvar. *Laciniata* L. (una varietà di kale, generalmente conosciuta come cavolo nero toscano) (Fig. 9.1), secondo la procedura seguente. Come materiale di partenza per l'estrazione sono stati scelti i germogli per il maggior contenuto di GLS rispetto al vegetale maturo. Semi (OD74) di cavolo nero sono stati fatti germogliare per 6 giorni, e dopo la raccolta, i germogli sono stati essiccati al liofilizzatore e tritati fino ad ottenere una polvere fine. Per l'estrazione dei principali GLS è stato utilizzato etanolo al 70 %, in modo da inattivare velocemente l'enzima mirosinasi, e prevenire così la conversione dei GLS ad ITC durante la procedura. L'estrazione è stata eseguita utilizzando un omogeneizzatore Ultraturrax, e l'omogenato ottenuto è stato centrifugato per 30 minuti a 17,000 x g a 10 °C. Dal sovranatante è stato poi eliminato il solvente in eccesso mediante rotavapor. Infine l'estratto è stato centrifugato e liofilizzato.

Il contenuto totale dei principali GLS presenti nell'estratto è stato valutato tramite analisi HPLC.

Figura 9.1. Brassica oleracea L. var. *acephala* (DC) subvar. *Laciniata* L. (una varietà di kale, generalmente conosciuta come cavolo nero toscano).



9.2 INCUBAZIONE DELL'ESTRATTO CON MIROSINASI ED ANALISI CHIMICHE

Per saggiare l'efficacia della trasformazione dei GLS a ITC, l'estratto è stato dissolto in 0.01 M PBS (pH 7.4) alla concentrazione di 15 mg/mL (la concentrazione più alta utilizzata in questo studio), e la conversione è stata effettuata, incubando l'estratto in soluzione, a 37 °C in presenza di una soluzione di MYR esogena (30 U/mL). La MYR utilizzata è stata estratta e isolata da semi di *Sinapis alba* L. (Bernardi *et al.* 2003), solubilizzata in acqua distillata, e conservata a 4 °C fino all'uso. L'attività specifica della soluzione enzimatica utilizzata in questo studio era di 60 U/mg di proteina solubile, mentre l'attività enzimatica era di 30 U/mL. Un'unità di MYR viene definita come la quantità di enzima in grado di idrolizzare 1 μ mol di sinigrina per minuto a 37 °C e pH 6.5 (Palmieri *et al.* 1982). Una soluzione di 15 mg/mL di TBCSE, contenente 3.1 ± 0.1 μ mol/mL di GL, GRA e glucoerucina (GER), è stata così incubata per 10 minuti con MYR, dopodiché è stata analizzata tramite GC-MS, in seguito ad estrazione con

diclorometano, per determinare il profilo degli ITC, e tramite HPLC per la quantificazione degli ITC totali (Matera *et al.* 2012, Zhang 2012a).

9.3 DISEGNO SPERIMENTALE

Animali

Gli esperimenti sono stati condotti su ratti maschi del ceppo *Sprague Dawley* (Fig. 9.2) del peso di 200 ± 10 g (nel primo esperimento), e di 165 ± 10 g (nel secondo esperimento). Gli animali, sono stati stabulati in condizioni ambientali controllate (Tabella 9.1) per una settimana prima dell'inizio degli esperimenti, ricevendo *pellet standard* per roditori (Mucedola s.r.l) ed acqua *ad libitum*.

Figura 9.2. Ratti del ceppo Sprague Dawley.



Tabella 9.1. Condizioni ambientali alle quali sono stati stabulati gli animali.

| Condizioni ambientali | |
|------------------------------|---------------|
| Ore di luce | 12 |
| Ore di buio | 12 |
| Temperatura | 22 ± 1 °C |
| Umidità | 60 ± 1 % |

Il disegno sperimentale di una prima fase del lavoro ha previsto la somministrazione *per os* o *ip* dell'estratto, dopo incubazione in presenza (MYR+) o in assenza (MYR-) di MYR esogena, a gruppi di ratti (n=6) suddivisi secondo lo schema seguente:

-Gruppo TBCSE *per os* MYR-: conversione parziale dei GLS a ITC, mediata da MYR intestinale;

-Gruppo TBCSE *per os* MYR+: conversione totale di tutti i GLS a ITC, mediata da MYR esogena;

-Gruppo TBCSE *ip* MYR-: assenza della reazione di idrolisi di GLS a ITC;

-Gruppo TBCSE *ip* MYR+: conversione totale di tutti i GLS a ITC, mediata da MYR esogeno;

-Gruppo CONTROLLO: somministrazione del solo veicolo (PBS).

L'estratto è stato somministrato giornalmente per 21 giorni consecutivi alla dose di 15 mg/kg p.c.. Questa dose contiene una quantità di GL comparabile con il consumo giornaliero medio di GLS nell'uomo (Steinbrecher *et al.* 2009).

Un'ulteriore fase sperimentale ha previsto la somministrazione *per os* di TBCSE, dopo incubazione in presenza o in assenza di MYR esogena, a ratti suddivisi nei sei gruppi sperimentali (n=6) seguenti:

- RD: ratti nutriti con dieta *standard* (18.7 % proteine, 5.6 % grassi, 4.5 % fibre) + veicolo (PBS);

- HFD: ratti nutriti con dieta ad alto contenuto di grassi (HFD) (22.5 % proteine, 23.1 % grassi, 5.7 % fibre, 1.0 % colesterolo) + veicolo (PBS);

- HFD + 15 mg/kg p.c.TBCSE MYR-: ratti alimentati con dieta HFD e trattati con TBCSE senza MYR: conversione parziale dei GLS a ITC, mediata da MYR intestinale;

- HFD + 150 mg/kg p.c.TBCSE MYR-: ratti alimentati con dieta HFD e trattati con TBCSE senza MYR: conversione parziale dei GLS a ITC, mediata da MYR intestinale;

- HFD + 15 mg/kg p.c.TBCSE MYR+: ratti alimentati con dieta HFD e trattati con TBCSE con MYR: +: conversione totale di tutti i GLS a ITC, mediata da MYR esogeno;

- HFD + 150 mg/kg p.c.TBCSE MYR+: ratti alimentati con dieta HFD e trattati con TBCSE con MYR: +: conversione totale di tutti i GLS a ITC, mediata da MYR esogeno.

Gli animali sono stati trattati giornalmente per 21 giorni consecutivi. La dose di 15 mg/kg p.c. contiene una quantità di GL comparabile con il consumo giornaliero medio nell'uomo (Steinbrecher *et al.* 2009), mentre la dose maggiore di 150 mg/kg p.c. è stata somministrata per studiare un possibile aumento degli effetti dose-dipendenti.

9.4 MONITORAGGIO DEL PESO CORPOREO E DEL CONSUMO DI CIBO

Il peso corporeo e il consumo di cibo sono stati registrati giornalmente subito prima dei trattamenti. Il consumo di cibo è stato stimato sottraendo la quantità di cibo rimasta nelle singole gabbie da quella somministrata giornalmente.

9.5 SACRIFICIO E PREPARAZIONE DELLE FRAZIONI SUBCELLULARI

Gli animali sono stati messi a digiuno la notte precedente il sacrificio, avvenuto il giorno dopo la fine del trattamento, mediante decapitazione con ghigliottina previo stordimento per roteazione, in accordo con le procedure Ministeriali in vigore. A ciascun animale è stato prelevato per intero il fegato, che è stato posto immediatamente in azoto liquido (-196°C) e conservato in freezer a -80°C fino al momento della preparazione della frazione microsomiale e citosolica. Inoltre, immediatamente prima del sacrificio, da ogni animale è stato prelevato un campione di sangue dalla vena caudale.

La maggior parte degli enzimi del metabolismo degli xenobiotici è situata nelle membrane lipofile del REL del fegato. Quando queste membrane lamellari sono isolate mediante omogeneizzazione dei tessuti e successivo frazionamento dei costituenti cellulari, esse tendono ad assumere la forma di vescicole chiamate microsomi. Questi ultimi conservano le caratteristiche morfologiche e funzionali delle membrane intatte, compreso il profilo enzimatico.

Prima dell'utilizzo, il fegato è stato lavato accuratamente in tampone di omogeneizzazione Tris-Acetato 0.1 M (pH 7.4) con KCl 1.15 % ed EDTA 1 mM allo scopo di rimuovere i residui di emoglobina che possono interferire nella determinazione delle attività enzimatiche in studio. L'organo è stato successivamente pesato e omogenato con 4 mL dello stesso tampone per ogni grammo di peso dell'organo, utilizzando un omogeneizzatore *potter* (con pestello in teflon) immerso in ghiaccio. L'omogenato è stato poi centrifugato a 9.000 x g alla temperatura di 2-3 °C per 20 minuti in una centrifuga preparativa (Sorwall RC5C). Il sovranatante post-mitocondriale S9 così ottenuto viene prelevato e centrifugato a 105.000 x g per 65 minuti ad una temperatura compresa tra 0 e 4 °C in ultracentrifuga (Sorwall ODT Combi 80.000). Il sovrinatante (citosol) viene recuperato, congelato in azoto liquido e stoccato a -80°C; mentre il precipitato viene risospeso in un

volume di tampone di lavaggio $K_2P_2O_7$ 0.1 M (pH 7.4) con EDTA 1 mM pari a quello del citosol eliminato, utilizzando un *potter* a mano immerso in ghiaccio per 5 minuti. Tale omogenato viene centrifugato nuovamente a $105.000 \times g$ per 65 minuti ad una temperatura compresa tra 0 e 4 °C in ultracentrifuga (Sorwall ODT Combi 80.000). Il precipitato viene risospeso in un volume di tampone finale Tris-Acetato 10 mM (pH 7.4) con EDTA 1 mM e glicerolo 20 % pari a quello del sovrantante eliminato utilizzando un *potter* a mano immerso in ghiaccio per almeno 7 minuti. I microsomi così ottenuti vengono congelati in azoto liquido e conservarli a -80°C. La preparazione della frazione microsomiale, secondo questa procedura, previene lo sviluppo della perossidazione lipidica e l'azione di proteasi, notoriamente attive anche a temperature inferiori a -60°C (Paolini *et al.* 1983).

9.6 DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DELLE PROTEINE CON IL METODO DI LOWRY

La stima quantitativa del contenuto proteico nei microsomi e nel citosol è richiesta in quanto le attività delle diverse isoforme sono espresse per mg di proteina. Il metodo è basato sulla formazione di complessi tra lo ione Cu^{2+} e quattro atomi di azoto peptidici delle proteine. In condizioni alcaline il Cu^{2+} è ridotto a Cu^{1+} . Quest'ultimo, attraverso i residui di tirosina e triptofano, catalizza a sua volta la riduzione dei sali di fosfotungstato e fosfomolibdato del reattivo di Folin. Tali Sali, così ridotti, generano un colore blu che può essere misurato a 700-750 nm. Vista la sensibilità del metodo, per ottenere una concentrazione proteica tale da rientrare nell'intervallo esplorato con gli *standards* (da 0 a 100 mg/mL), al cui interno la curva di taratura risulta lineare, si diluisce il campione 200 volte (microsomi) o 500 volte (citosol) con acqua bidistillata. La risposta viene riferita a quella ottenuta attraverso una curva *standard* di albumina sierica bovina di 100 mg/mL in acqua, concentrazione che risulta nella parte superiore dell'intervallo di linearità. Vengono preparate una serie di provette suddivise in *standard*, bianchi e

prove, in cui vengono posti rispettivamente 1 mL di albumina *standard*, 1 mL di acqua bidistillata e 1 mL di campione microsomiale o citosolico diluito.

A tempo in ogni provetta si aggiungono vortexando:

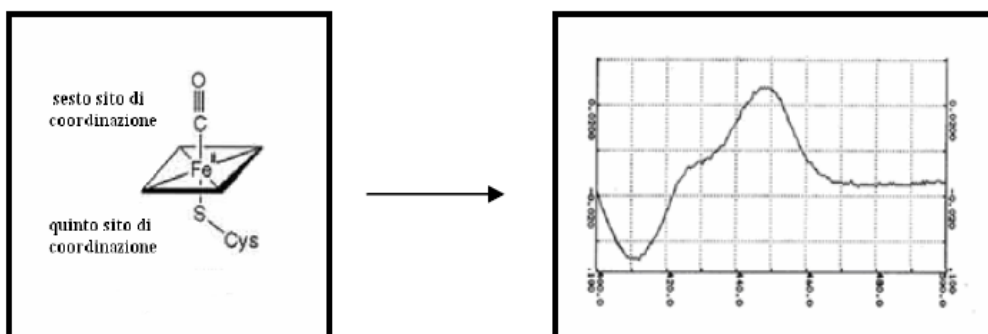
- 2 mL di reagente rameico in soluzione alcalina vortexando (tenendo conto del rapporto 0.5 mL di soluzione di CuSO_4 0.5% (p/v) in sodio citrato 1% + 25 mL di soluzione di Na_2CO_3 in NaOH 0.1 N).
- 0.2 mL di reattivo di Folin-Ciocalteu opportunamente diluito (tenendo conto del rapporto 2 mL di reagente di Folin-Ciocalteu concentrato + 3 mL di acqua bidistillata);

Il contenuto proteico di ogni provetta viene determinato in termini di assorbanza mediante lettura allo spettrofotometro a 750 nm contro l'acqua (Lowry *et al.* 1951).

9.7 DETERMINAZIONE DEL CITOCROMO P450

Il citocromo P450 viene determinato osservando la differenza di assorbimento fra 450 e 490 nm dello spettro differenziale ottenuto fra citocromo P450 ridotto e legato a CO rispetto alla forma ridotta ($\epsilon = 91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Figura 9.3. Spettro differenziale con caratteristico picco di assorbimento a 450 nm del core emimico del citocromo P450 complessato a CO.



In seguito alla riduzione del ferro del gruppo eme a ione ferroso (Fe^{2+}), il citocromo acquisisce la capacità di legare il monossido di carbonio (CO) al sesto sito di coordinazione. Il complesso $\text{COFe}^{2+}\text{-S-cys}$, rispetto alla forma ridotta libera, conferisce al citocromo un caratteristico picco di assorbimento tra 447 e 452 nm (Fig. 9.3) (Omura *et al.* 1964).

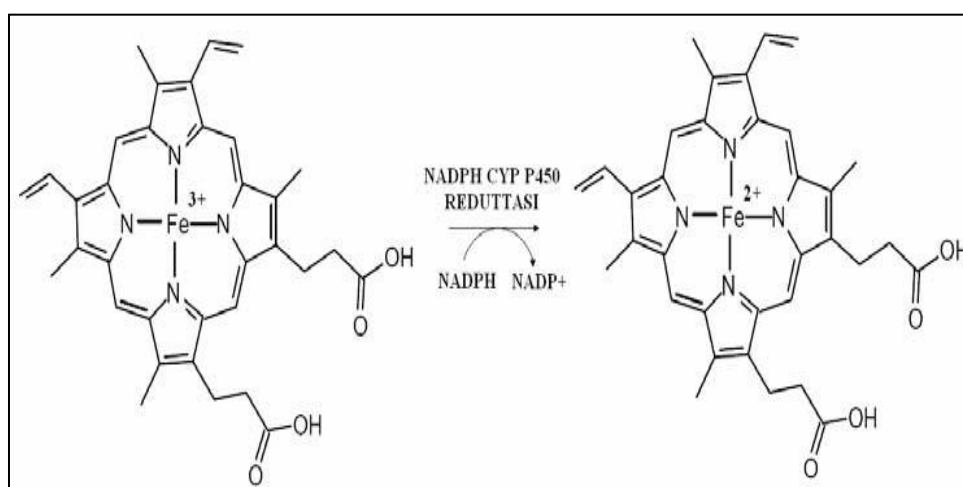
9.8 STUDIO DELLE ATTIVITÀ ENZIMATICHE

9.8.1 SAGGI PER LA DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ SPECIFICA DEGLI ENZIMI DI FASE I

9.8.1.1 NADPH-CITOCROMO (P450)-C-REDUTTASI

Questa attività è basata sulla capacità della NADPH citocromo (P450) c-reduttasi di ridurre il gruppo eme del citocromo c impiegando gli elettroni forniti dal NADPH. Il prodotto di reazione (citocromo c - Fe^{2+}) può essere monitorato spettrofotometricamente per via della sua assorbanza specifica a 550 nm (Fig. 9.4). L'attività specifica viene calcolata utilizzando il coefficiente di estinzione molare $\epsilon = 19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Bruce 1967).

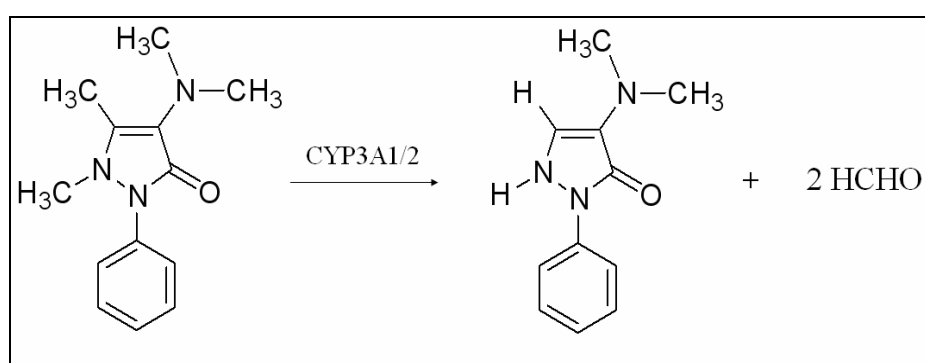
Figura 9.4. Riduzione dell'eme del citocromo c ad opera della NADPH citocromo (P450) c-reduttasi.



9.8.1.2 AMMINOPIRINA N-DEMETILASI

La determinazione dell'amminopirina N-demetilasi (APND) è basata sulla capacità dell'isoforma CYP3A1/2 di demetilare in modo specifico l'amminopirina e generare un composto dealchilato e formaldeide come prodotti di reazione (Fig. 9.5).

Figura 9.5. Metabolismo dell'amminopirina da parte dell'isoforma CYP3A1/2.

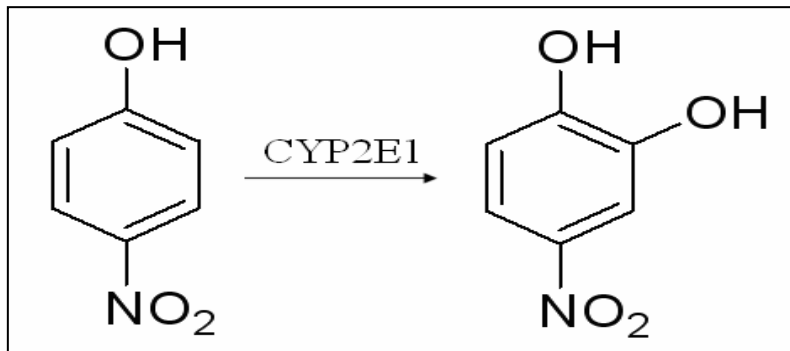


La formaldeide, in presenza di acetilacetone e sali di ammonio (reagente di Nash), reagisce formando la 3,5-diacetil-1,4-diidrolutidina (DDL), un composto di colore giallo la cui formazione può essere monitorata spettrofotometricamente per via della sua assorbanza a 412 nm. L'attività specifica si calcola utilizzando il coefficiente di estinzione molare $\epsilon = 8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Nash 1953).

9.8.1.3 P-NITROFENOLO IDROSSILASI

L'attività della p-Nitrofenolo idrossilasi (pNFI) è basata sul fatto che il p-nitrofenolo è metabolizzato dall'isoforma CYP2E1 a 4-nitrocatecolo (Fig. 9.6) che, in ambiente alcalino, assorbe a 546 nm. L'attività specifica si calcola utilizzando il coefficiente di estinzione molare $\epsilon = 10.28 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Reinke *et al.* 1985).

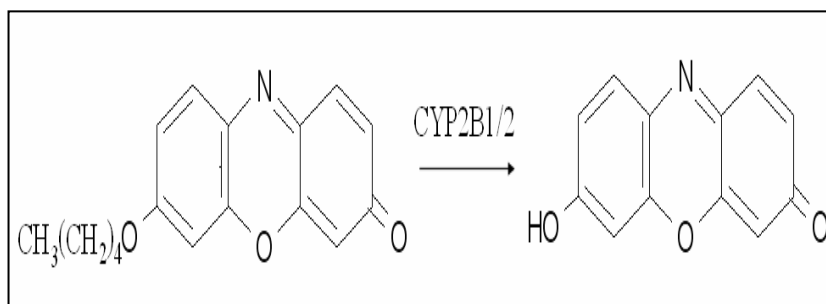
Figura 9.7. Formazione del 4-nitrocatecolo ad opera dell'isoforma CYP2E1.



9.8.1.4 PENTOSSIRESORUFINA O-DEALCHILASI, METOSSIRESORUFINA O-DEMETILASI, ETOSSIRESORUFINA O-DEETILASI

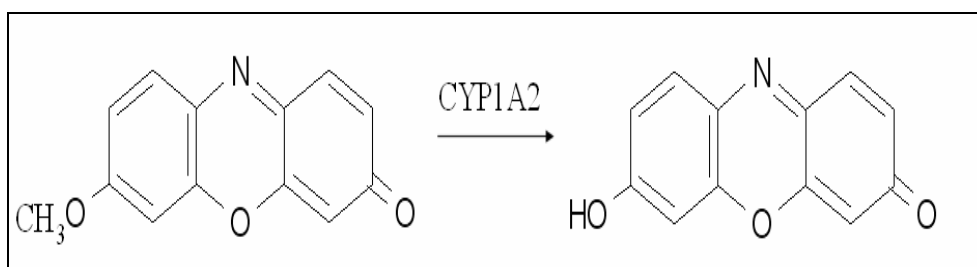
La pentossiresorufina (PROD) viene utilizzata come *probe* specifico per la determinazione dell'attività dell'isoforma CYP2B1/2. Il prodotto di reazione è la resorufina (Fig. 9.8) la cui formazione viene monitorata spettrofluorimetricamente seguendo un aumento del suo segnale di emissione di fluorescenza a 588 nm. Si registra la cinetica temporale della reazione e si determina l'attività specifica confrontando i valori ottenuti con quelli relativi ad aggiunte *standard* di resorufina alla miscela di incubazione, al *plateau* della cinetica temporale registrata (Lubet *et al.* 1985).

Figura 9.8. Metabolismo della pentossiresorufina a resorufina ad opera dell'isoforma CYP2B1/2.



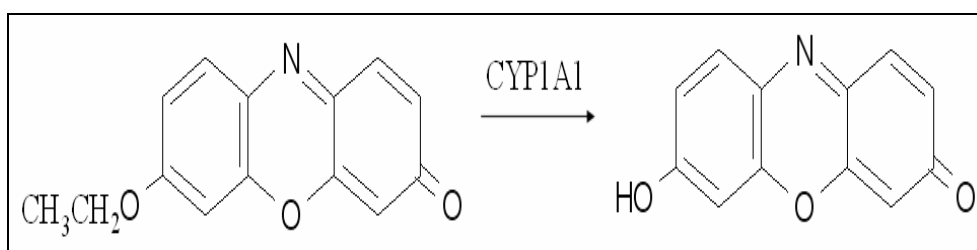
La metossiresorufina (MROD) viene invece utilizzata come *probe* specifico per la determinazione dell'attività dell'isoforma CYP1A2. Il prodotto di reazione è sempre la resorufina (Fig. 9.9). Questa attività viene determinata in modo del tutto analogo alla precedente (Burke *et al.* 1985).

Figura 9.9. Metabolismo della metossiresorufina a resorufina ad opera dell'isoforma CYP1A2.



L'etossiresorufina (EROD) è impiegata come *probe* specifico per l'isoforma CYP1A1 che genera come prodotto di reazione la resorufina (Fig. 9.10). Anche questa attività viene determinata in modo analogo a quelle descritte sopra (Lubet *et al.* 1985).

Figura 9.10. Metabolismo dell'etossiresorufina a resorufina ad opera dell'isoforma CYP1A1.

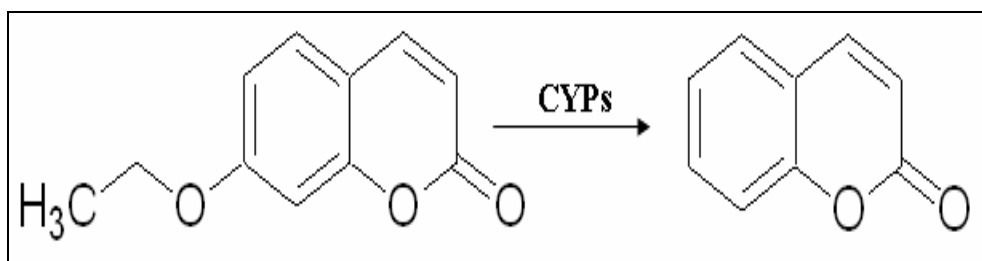


9.8.1.5 7-ETOSSICUMARINA O-DEETILASI

La determinazione della 7-Etossicumarina O-deetilasi (ECOD) è basata sulla capacità di diverse isoforme di citocromo P450 (CYP1A1/2, CYP2A,

CYP2B e CYP2E1) di dealchilare la 7-etossicumarina generando come prodotto di reazione l'umbelliferone (Fig. 9.11). Quest'ultimo, eccitato a 390 nm, emette fluorescenza a 440 nm in ambiente alcalino. L'attività specifica viene determinata utilizzando una curva di taratura ottenuta impiegando quantità note di prodotto di reazione (umbelliferone) (Aitio 1978).

Figura 9.11. Metabolismo della 7-etossicumarina da parte di diverse isoforme CYPs.

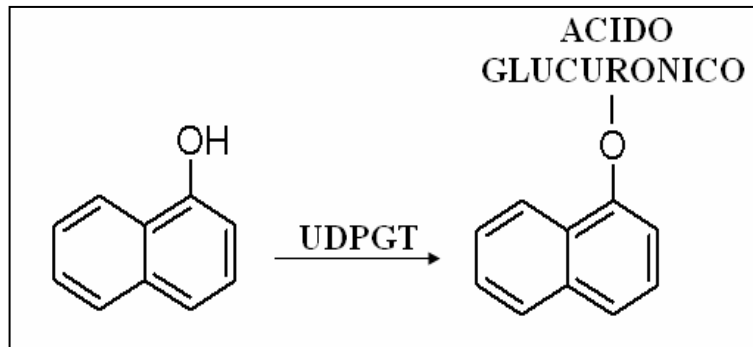


9.8.2 SAGGI PER LA DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ SPECIFICA DEGLI ENZIMI DI FASE II

9.8.2.1 UDP-GLUCURONILTRANSFERASI

La determinazione dell'UDP-glucuroniltransferasi (UDPGT) viene eseguita sfruttando la capacità delle UDPGT di catalizzare la formazione di un legame glicosidico fra il substrato 1-naftolo e l'acido glucuronico (Fig. 9.12). Il prodotto di reazione, l'1-naftolo-glucuronide, può essere monitorato spettrofluorimetricamente in quanto emette fluorescenza a 335 nm. L'attività specifica viene calcolata confrontando i valori ottenuti con quelli relativi ad aggiunte standard di 1-naftolo-glucuronide alla miscela di incubazione al *plateau* della cinetica temporale registrata (Mackenzie *et al.* 1980).

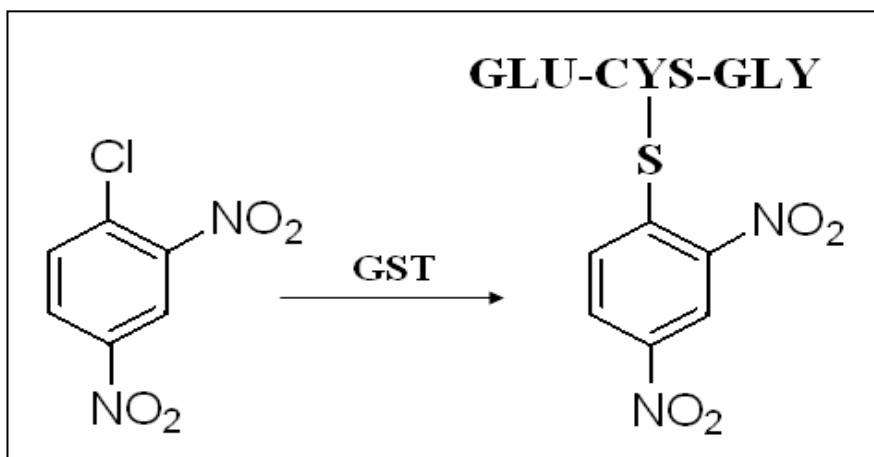
Figura 9.12. Glucuroconiugazione dell'1-naftolo.



9.8.2.2 GLUTATIONE S-TRANSFERASI

L'attività della glutatione S-transferasi (GST) viene determinata sulla base della capacità di questo enzima di coniugare il substrato 1-Cl-2,4-dinitrobenzene (CDNB) con il glutatione ridotto (GSH) per dare il prodotto 1-(Sglutationoil)-2,4-dinitrobenzene (Fig. 9.13). Quest'ultimo assorbe in modo specifico a 340 nm e può quindi essere rilevato spettrofotometricamente. L'attività specifica viene calcolata utilizzando il coefficiente di estinzione molare $\epsilon = 9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Habig *et al.* 1974).

Figura 9.13. Coniugazione del CDNB con glutatione.



9.8.3 SAGGI PER LA DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ SPECIFICA DEGLI ENZIMI ANTIOSSIDANTI

9.8.3.1 CATALASI

L'attività della catalasi (CAT) è stata misurata seguendo spettrofotometricamente a 240 nm la decomposizione di H₂O₂ ad opera dell'enzima. L'attività specifica è stata calcolata considerando il coefficiente di estinzione molare di 43,6 M⁻¹ cm⁻¹ ed è espressa come µmoli di H₂O₂ consumate per minuto per milligrammo di proteine cellulari (Wheeler *et al.* 1990).

9.8.3.2 NAD(P)H:CHINONE REDUTTASI

La determinazione dell'attività della NAD(P)H:chinone reduttasi (NQO1) si basa sulla capacità di questo enzima di catalizzare la formazione di idrochinoni a partire da molecole chinoniche. Si segue spettrofotometricamente a 600 nm la riduzione del diclorofenolo-indofenolo (DCPIP, un accettore di elettroni) a metabolita incolore. L'attività è stata calcolata considerando il coefficiente di estinzione molare del DCPIP $\epsilon = 22.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ed è espressa come nmoli di DCPIP ridotto per minuto per milligrammo di proteine cellulari (Ernster 1967).

9.8.3.3 GLUTATIONE REDUTTASI

L'attività della glutatione reduttasi (GSSG-Red) è stata misurata a 37°C seguendo a 340 nm il consumo di NADPH, considerando che il NADPH agisce come donatore di equivalenti riducenti in rapporto 1:1 con il GSH che viene ridotto. Il calcolo dell'attività è stato eseguito considerando il coefficiente di estinzione molare 6.22 mM⁻¹cm⁻¹ ed è espressa come nmoli di NADPH consumate per minuto per milligrammo di proteine cellulari (Wheeler *et al.* 1990).

9.8.3.4 GLUTATIONE PEROSSIDASI

L'attività della glutazione perossidasi (GSH-px) è stata dosata a 37° monitorando a 340 nm il consumo di NADPH in una miscela di reazione contenente, oltre al citosol e al NADPH, il GSH ridotto, il t-butilidroperossido e l'enzima GSSG reduttasi. L'attività della GSH-px si calcola usando il coefficiente d'estinzione molare $\varepsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, ed è espressa come nmoli di NADPH consumate per minuto per milligrammo di proteine cellulari (Flohé *et al.* 1984).

9.8.3.5 SUPEROSSIDO DISMUTASI

L'attività della superossido dismutasi (SOD) è stata determinata misurando a 420 nm l'inibizione da parte della superossido dismutasi dell'autoossidazione del pirogallolo. Per il calcolo dell'attività totale della SOD, espressa in nmoli di prodotto generato al minuto per milligrammo di proteine cellulari, è necessario riferirsi ad una curva standard costruita mediante l'utilizzo di SOD commerciale a varie concentrazioni (Marklund *et al.* 1974).

9.9 ANALISI EMATOCHIMICHE

Il sangue prelevato dalla vena caudale dei ratti prima del sacrificio è stato centrifugato in provette eparinizzate per 15 minuti a 1.500 x g, per ottenere campioni di siero. Presso il laboratorio centralizzato SEPAC VET, della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Bologna, tali campioni sono stato analizzati per la determinazione di alcuni parametri ematochimici, tra cui, glucosio, creatinina, albumina totale, alanina amminotransferasi (ALT), colesterolo totale (TC), trigliceridi (TRGs) e acidi grassi non esterificati (NEFA).

9.10 ESPRESSIONE DEI RISULTATI ED ANALISI STATISTICA

I valori riportati sono stati ottenuti da sei differenti animali e sono espressi nelle tabelle come la media di sei esperimenti \pm deviazione *standard*. Nei grafici i risultati sono espressi come variazione percentuale dei trattati rispetto al controllo. Per una valutazione statistica rigorosa è stata determinata la probabilità di evenienza casuale (p), ponendo come limiti di significatività $p=0.05$ cioè 5 %, e $p=0.01$ cioè 1%, per cui risultano significative le differenze in cui $p < 5\%$ o $< 1\%$. La probabilità di evenienza casuale è stata determinata attraverso il metodo statistico di Wilcoxon (Box *et al.* 1978).

Parte sperimentale svolta all'estero

9.11 PERFUSIONE EPATICA E ISOLAMENTO DI EPATOCITI PRIMARI

Gli epatociti sono stati isolati da ratti maschi del ceppo Wistar del peso di 200-300 g, attraverso una tecnica di perfusione a due fasi (Hengstler *et al.* 2000). A tale scopo gli animali sono stati anestetizzati con una somministrazione combinata per via ip di 20 mg/kg p.c. di xilazina (Rompun 2 %, Bayer, Leverkusen, Germany), e 61.5 mg/kg p.c. di ketamina (Ratiopharm, Ulm, Germany). Il fegato è stato perfuso attraverso la vena porta per 15 minuti con EGTA-buffer a 37 °C. L'EGTA-buffer consiste di 248 mL di soluzione di glucosio (9 g/L D-glucose), 40 mL KH-buffer (60 g/L NaCl, 1.75 g/L KCl, e 1.6 g/L KH₂PO₄; portato a pH 7.4), 40 mL HEPES-buffer (60 g/L HEPES; portato a pH 8.5), 60 mL soluzione di aminoacidi (0.27 g/L L-alanina, 0.14 g/L L-acido aspartico, 0.4 g/L L-asparagina, 0.27 g/L L-citrullina, 0.14 g/L L-cisteina, 1 g/L L-istidina, 1 g/L L-acido glutammico, 1 g/L L-glicina, 0.4 g/L L-isoleucina, 0.8 g/L L-leucina, 1.3 g/L L-lisina, 0.55 g/L L-metionina, 0.65 g/L L-ornitina, 0.55

g/L L-fenilalanina, 0.55 g/L L-prolina, 0.65 g/L L-serina, 1.35 g/L L-treonina, 0.65 g/L L-triptofano, 0.55 g/L L-tirosina, 0.8 g/L L-valina; gli aminoacidi che non venivano dissolti a pH neutro, sono stati solubilizzati aggiungendo NaOH 10 N a pH 11.0 e aggiustando a pH 7.6), 2 mL soluzione di glutamina (7 g/L L-glutamina) e 0.8 mL di soluzione EGTA (47.5 g/L EGTA, sciolta con NaOH, e portata a pH 7.6).

Dopo questa prima fase la perfusione è stata continuata per ulteriori 15 min con una soluzione di collagenasi a 37 °C, composta da: 155 mL di una soluzione di glucosio, 25 mL KH-buffer, 25 mL HEPES-buffer, 38 mL soluzione di aminoacidi, 10 mL di soluzione di CaCl₂ (19 g/L CaCl₂ x 2 H₂O), 2.5 mL di soluzione di glutamina, e 90 mg di collagenasi tipo I (Sigma, Taufkirchen, Germany).

Dopo la perfusione il fegato è stato rimosso e dissociato in una soluzione di sospensione (124 mL di soluzione di glucosio, 20 mL KH buffer, 20 mL HEPES buffer (pH 7.6), 30 mL soluzione di aminoacidi, 2 mL soluzione di glutamina, 1.6 mL soluzione di CaCl₂, 0.8 mL di soluzione MgSO₄ (24.6 g/L MgSO₄ x7 H₂O) e 0.4 g di albumina sierica bovina.

La sospensione di epatociti così ottenuta è stata filtrata attraverso un filtro con pori di diametro di 100 µm e centrifugata per 5 min a 50 x g. Il *pellet* cellulare è stato poi lavato due volte con soluzione di sospensione, ricentrifugato, e risospeso in 30 mL di soluzione di sospensione.

La vitalità cellulare è stata valutata attraverso un saggio di colorazione con *trypan blue*, un colorante in grado di attraversare la membrana delle cellule morte, colorandole di blu. Al microscopio ottico sono state contate le cellule vive (traslucide) e quelle morte (blu), nei quadrati di ognuna delle due camere dell'emocitometro, facendo infine una media dei conteggi. Solo le sospensioni di epatociti ottenute con una vitalità maggiore dell'80% sono state considerate per gli esperimenti successivi.

9.12 COLTURA DI EPATOCITI PRIMARI

Gli epatociti così isolati sono stati coltivati in piastre con un doppio strato di collagene (*sandwich*). Studi precedenti hanno riportato che questo sistema di coltura ben stabilito, può essere applicato per studiare in modo riproducibile le alterazioni dell'espressione genica cellulare (Hengstler *et al.* 2000).

Per la preparazione del *sandwich* di collagene, 10 mg di collagene, isolato dalla coda di ratto, è stato solubilizzato per tutta la notte precedente all'esperimento, in 12 mL di acido acetico 0.2 % (v/v), a 4 °C. Successivamente sono stati aggiunti 1.2 mL di terreno DMEM 10x (Biozol, Eching, Germany), e la soluzione di collagene acida è stata neutralizzata con una soluzione 1M di NaOH. 250 µl di questa soluzione di collagene è stata così aggiunta in ognuno dei sei pozzetti delle piastre di coltura utilizzate (Sarstedt, Nümbrecht, Germany), ed è stata lasciata polimerizzare per 30-45 minuti a temperatura ambiente.

Gli epatociti sono stati così seminati su questo primo strato di collagene, con una densità di 1×10^6 cellule per pozzetto, contenente 2 mL di terreno di coltura William's E Medium (WME) addizionato con 10 % siero fetale bovino, 100 unità/mL penicillina, 0.1 mg/mL streptomina, 10 µg/mL gentamicina, e 100 nM dexametasone, e incubate per 3 ore a 37 °C e 5 % CO₂. Dopo tale periodo le cellule sono state lavate due volte con WME a 37 °C. Dopo la rimozione del terreno di coltura, il secondo strato di collagene è stato aggiunto in ogni pozzetto, come descritto precedentemente per il primo. Dopo 30-40 minuti di polimerizzazione all'interno dell'incubatore, in ogni pozzetto, contenente epatociti all'interno di un doppio strato di collagene, è stato aggiunto il terreno di coltura addizionato.

9.13 ESPOSIZIONE DEGLI EPATOCITI PRIMARI

I composti derivati da Brassicaceae utilizzati in questo studio, SFN (Sigma-Aldrich), GRA (Enzo Life Sciences), I3C (Sigma-Aldrich), DIM (Sigma-

Aldrich), e BaP (Sigma-Aldrich), sono stati solubilizzati in dimetilsolfossido (DMSO). Tali soluzioni sono state mescolate con il terreno di coltura in quantità tali da raggiungere nei pozzetti delle piastre la concentrazione del composto desiderata e lo 0.1 % di DMSO. Come descritto sopra, gli epatociti sono stati incubati in piastre a sei pozzetti, di cui tre sono stati utilizzati per 3 replicati tecnici dell'esposizione ad una certa molecola, ed i restanti tre come controlli, esposti solo al solvente DMSO 0.1%. Per ogni condizione studiata sono stati quindi eseguiti tre replicati tecnici, inoltre, ogni esperimento è stato effettuato almeno in triplicato utilizzando epatociti isolati da diversi ratti in giorni diversi.

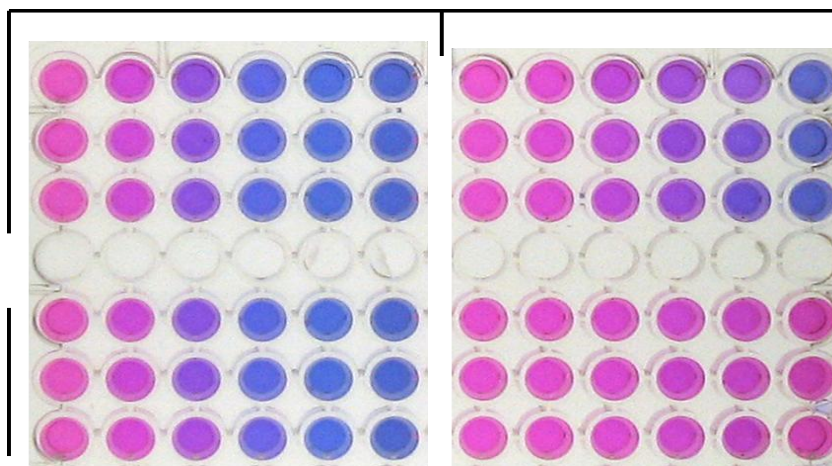
9.14 STUDIO DELLA CITOTOSSICITÀ

La citotossicità dei composti in studio è stata valutata attraverso il saggio *Cell Titer Blue* (Promega). Questo metodo si basa sull'abilità delle cellule viventi di convertire il colorante resazurina (blu) in un prodotto finale fluorescente, resorufina (rosa), (Fig. 9.14) che può essere rilevata mediante lettura con spettrofluorimetro (ecc: 540 nm; em: 595 nm).

Dopo 24 ore dalla semina, gli epatociti primari in coltura sono stati esposti per 72 ore ai seguenti intervalli di concentrazione: SFN (0.79-100 μM); GRA (0.006-200 μM), I3C (6.25-400 μM); DIM (6.25-400 μM); BaP (0.09-300 μM). Dopo tale periodo di esposizione, il reagente Cell Titer Blue è stato aggiunto direttamente nel terreno di coltura, e dopo un tempo di incubazione di 4 ore, aliquote del terreno sono state lette allo spettrofluorimetro. Dai dati di vitalità cellulare ottenuti, mediante un'analisi statistica di regressione, per ogni molecola testata, è stata calcolata la concentrazione effettiva che provoca la riduzione di vitalità cellulare del 20 % (EC20), ponendo i risultati ottenuti dalle cellule di controllo trattate solo con solvente, come 100% di vitalità. La morfologia e lo stato degli epatociti sono stati inoltre valutati durante tutta la durata dell'esperimento tramite l'osservazione al microscopio. Le concentrazioni EC20, determinate tramite questo saggio, sono state impiegate negli esperimenti successivi, in quanto,

seppur mostrando un citotossicità consistente, hanno permesso di mantenere in vita un numero di cellule sufficiente per studiare i meccanismi alla base della tossicità tramite ulteriori analisi.

Figura 9.14. Esempio del saggio Cell Titer Blue.



9.15 SAGGIO DEI TBARS

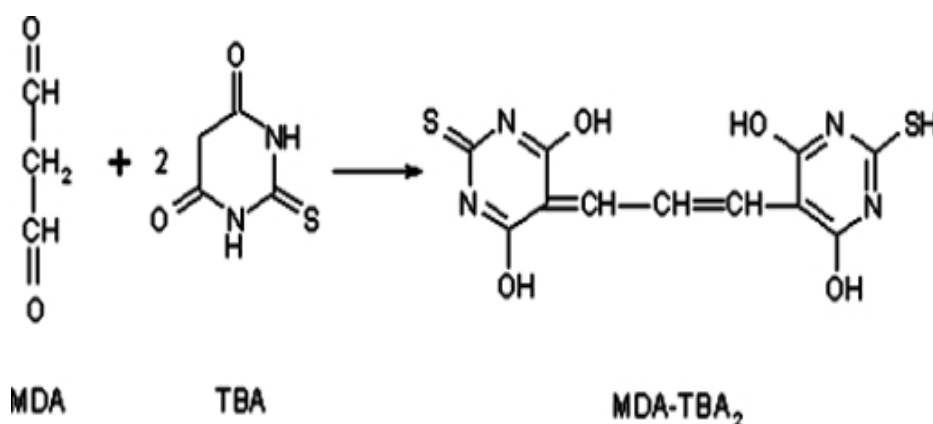
La Malondialdeide (MDA) ($\text{CH}_2(\text{CHO})_2$), è il principale prodotto della perossidazione lipidica, e viene utilizzato come indicatore di stress ossidativo. Il dosaggio delle sostanze reattive con l'acido tiobarbiturico (TBARS) è un metodo stabilito per studiare la perossidazione lipidica (Yagi 1998).

Questo saggio, che è stato eseguito con il *TBARS Assay Kit* (Cayman's), sfrutta la spontanea reattività chimica della MDA con l'acido tiobarbiturico (TBA), la cui condensazione origina un addotto facilmente rilevabile spettrofotometricamente, ad una lunghezza d'onda di 532 nm (Fig. 9.15).

Dopo 24 ore di esposizione alle rispettive EC₂₀ di ogni molecola, il *sandwich* di collagene è stato digerito con una soluzione di collagenasi del tutto analoga a quella descritta nel paragrafo 9.11. Il *pellet* cellulare è stato così raccolto, omogenato e diluito opportunamente in tampone PBS secondo il protocollo fornito dal *kit*. La miscela di reazione, contenente l'omogenato

cellulare, sodio dodecilsolfato (SDS), soluzione di acido acetico, soluzione di NaOH, e acido tiobarbiturico, è stata incubata per un'ora a 100 °C. Dopo tale periodo la reazione è stata fermata immediatamente mettendo i campioni in ghiaccio. Dopo dieci minuti, i campioni sono stati centrifugati a 1,600 x g per dieci minuti a 4 °C, e letti allo spettrofotometro. Dall'assorbanza misurata, è stata così determinata la concentrazione in μM di MDA dei campioni, grazie all'utilizzo di una curva *standard* con concentrazione nota di MDA.

Figura 9.15. Reazione della malondialdeide (MDA) con l'acido tiobarbiturico (TBA).



9.16 ESTRAZIONE DELL'RNA TOTALE

Per lo studio della modulazione dell'espressione genica, gli epatociti, 24 ore dopo il loro isolamento, sono stati esposti alle molecole in studio alle rispettive EC20. Dopo 24 ore di esposizione, è stato rimosso il terreno di coltura, ed è stato aggiunto immediatamente 1 mL di QIAzol (QIAGEN, Hilden, Germany). Il lisato cellulare ottenuto è stato raccolto in tubi *ependorf* e sonificato per 30 secondi. L'RNA totale è stato conseguentemente estratto secondo le indicazioni del produttore: 0.2 mL di cloroformio sono stati aggiunti ad ogni campione, dopodiché sono stati agitati e centrifugati a 12,000 x g per 15 minuti a 4 °C. Il sovratanante

ottenuto (fase acquosa contenente l'RNA) è stata trasferita in nuove *eppendorf* insieme a 0.5 mL di isopropanolo e vortexati. Dopo 10 minuti i campioni sono stati nuovamente centrifugati a 12,000 x g per 10 minuti a 4 °C. Il sovrinatante è stato poi scartato, il *pellet* di RNA risospeso in 1 mL di etanolo al 75 %, e centrifugato a 7500 x g per 5 min a 4°C. Infine, il sovrinatante è stato rimosso completamente, e il *pellet* di RNA è stato dissolto con acqua priva di RNasi.

9.17 VALUTAZIONE QUANTITATIVA E QUALITATIVA DELL'RNA

I campioni di RNA ottenuti sono stati esaminati al *Nano-drop* ND-1000 per ricavare la concentrazione in µg/ml di RNA estratto, a 260 nm, e valutare il grado di purezza del campione, per cui un rapporto di assorbimento a 260/280 nm > 1.7 indicava un buon contenuto di acidi nucleici (principalmente RNA) rispetto al contenuto di proteine.

Infine, l'integrità della macromolecola estratta è stata valutata correndo almeno 0.5 µg di RNA su gel di agarosio all'1.5% ad un voltaggio costante di 160 V, e visualizzato con etidio bromuro, in cui un campione di RNA non degradato viene separato nelle due caratteristiche bande a 28s e 18s.

9.18 STUDIO DELL'ESPRESSIONE GENICA

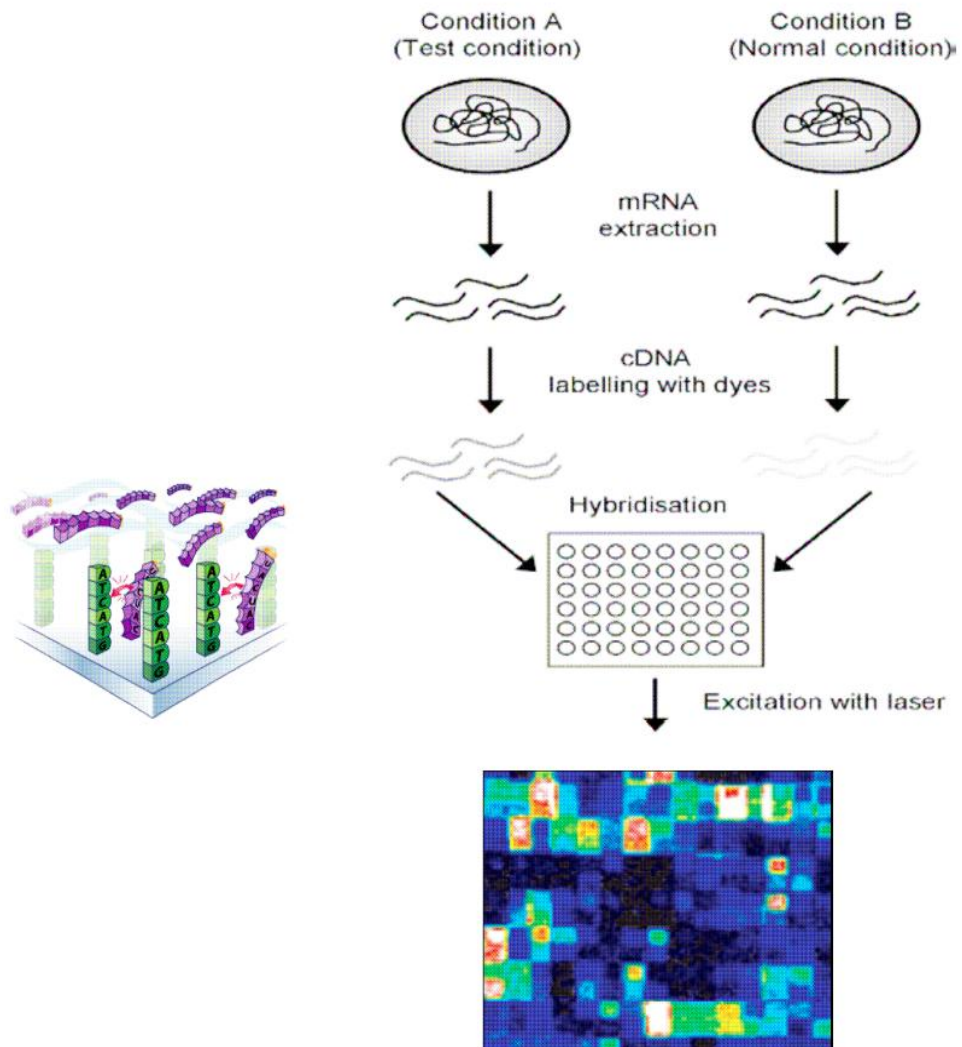
L'analisi dell'espressione genica è stata effettuata tramite l'utilizzo di *microarrays* in collaborazione con la piattaforma *Affymetrix* dell'Università di Colonia, Germania (Balmer *et al.* 2012, Krug *et al.* 2013). I *microarrays* sfruttano una tecnica di ibridazione inversa, tra oligonucleotidi sintetici (detti *probes*) fissati su un supporto, e gli acidi nucleici marcati in esame (detti *target*) (Fig. 9.16). 100 ng di RNA, estratto secondo la metodica descritta sopra, è stato convertito in cDNA: il primo filamento è stato sintetizzato utilizzando un oligo-dT *primer*, con una sequenza T7 *promoter*, poi il secondo filamento, secondo complementarietà delle basi, grazie ad

una trascrittasi inversa. Il cDNA a doppio filamento ottenuto, è stato utilizzato per una trascrizione secondo, l'*IVT, standard Affymetrix procedure*, utilizzando il *Genechip 30 IVT Express Kit*. In questo modo, è stato sintetizzato l'aRNA (RNA amplificato o cRNA), in cui è stato incorporato un nucleotide biotinilato come marcatore. L'aRNA è stato poi frammentato con sfere magnetiche, in *buffer* di frammentazione seguendo le istruzioni del fornitore. 12.5 µg di aRNA frammentato è stato così ibridizzato con gli *Affymetrix microarrays*. I *chips* sono stati posti in un incubatore per l'ibridazione (*GeneChip Hybridization Oven-645*) per 16 ore, a 60 rpm e a 45 °C. Per la colorazione e il lavaggio sono stati utilizzati *AffymetrixHWS kits* su una *Genechip Fluidics Station-450*. Gli *Affymetrix microarrays* sono stati successivamente analizzati tramite lettura con *scanner (Affymetrix Gene-Chip Scanner-3000-7G)*, per rilevare le intensità e le posizioni dei segnali, e una valutazione della qualità delle immagini ottenute, è stata effettuata con *Affymetrix GCOS software*.

Da queste procedure sono stati ottenuti dei *CEL files*, che sono stati utilizzati per le analisi statistiche dei dati.

Tutti gli strumenti e reagenti utilizzati in questa fase sono stati forniti da *Affymetrix*, Santa Clara, CA, USA.

Figura 9.16. Rappresentazione schematica dello studio dell'espressione genica tramite l'utilizzo di *microarrays*.



9.19 ESPRESSIONE DEI RISULTATI ED ANALISI STATISTICA

Dai risultati dello studio della citotossicità è stata calcolata, tramite un'analisi di regressione, il valore di EC20 per ogni *phytochemical* utilizzato.

I risultati del saggio dei TBARS sono espressi come la media di 3 esperimenti \pm deviazione *standard*, e la differenza rispetto al campione di controllo è stata analizzata tramite il *t-test*, in cui risultano significative le differenze per cui $p < 5\%$ o $<1\%$ cioè la probabilità di evenienza casuale è minore del 5% o 1%.

I risultati ottenuti dall'analisi dei *microarrays* sono stati analizzati in collaborazione con il Dipartimento di Statistica dell'Università di Dortmund, (Germania). Un *moderated t-test R-package* (Limma) è stato effettuato per valutare le differenze significative relative all'espressione genica tra i campioni esposti alle molecole in studio e i rispettivi controlli, in cui risultano significative le differenze per cui $p < 5\%$ cioè la probabilità di evenienza casuale è minore del 5%.

9.19.1 ANALISI DELLE COMPONENTI PRINCIPALI

L'analisi delle componenti principali (PCA) è una tecnica per la semplificazione dei dati, con lo scopo principale di ridurre un numero elevato di variabili (rappresentative del fenomeno analizzato) in alcune principali variabili latenti. Ciò avviene tramite una trasformazione lineare delle variabili che proietta quelle originarie in un nuovo sistema cartesiano, in cui la variabile con maggiore varianza viene proiettata sul primo asse e la seconda sul secondo asse. Questa riduzione della "complessità" avviene riducendo la dimensione dello spazio di rappresentazione, tramite l'individuazione di opportune trasformazioni lineari delle variabili osservate e capaci di evidenziare e sintetizzare l'informazione insita nella matrice iniziale.

In questo studio la PCA è stata utilizzata per visualizzare i dati di espressione genica in due dimensioni, che rappresentano le prime due componenti principali, cioè le due direzioni, perpendicolari tra loro, che rappresentano la maggior varianza dei dati. Per questa analisi è stato utilizzato il *software R-version 2.15.1*, che ha permesso di calcolare e di ottenere, una rappresentazione grafica del *pattern* complessivo di espressione genica, ottenuto tramite l'analisi dei *microarrays*, per ogni condizione sperimentale studiata. Per diminuire la variabilità sperimentale non biologica (*batch effect*), al valore di ogni campione è stato sottratto il valore del rispettivo controllo. In questo modo il *batch effect* può essere corretto e/o diminuito rendendo così confrontabili e raggruppabili differenti *set* di dati (Krug *et al.* 2013).

9.19.2 HEATMAP

Per una visualizzazione più specifica del grado di espressione genica, è stata elaborata una *heatmap*, basata sui 100 geni più significativi modulati dalle molecole in studio, con i più bassi valori di FDR - valore di p corretto, secondo il Limma *t test*. In questo tipo di rappresentazione, effettuata tramite il *software R-version 2.15.1*, viene visualizzato il grado di espressione genica con una scala di colori (dal giallo al rosso), e viene creata una struttura gerarchica di raggruppamento, chiamata dendrogramma, basata sulla correlazione di *Pearson*, che fornisce informazioni qualitative sul grado di somiglianza riguardante il *pattern* di espressione genica (Krug *et al.* 2013).

9.19.3 ANALISI DELL'ONTOLOGIA GENICA

Per ottenere informazioni relative ai principali processi biologici influenzati dalle molecole utilizzate, i geni modulati significativamente, sono stati sottoposti ad un'analisi ontologica genica, *gene ontology (GO) analysis*, col fine di suddividerli in categorie funzionali. A tal proposito, il progetto GO

fornisce un'ontologia di termini ben definiti per la descrizione di prodotti genici in termini di funzione molecolare, di ruolo biologico e di ubicazione cellulare (Kammers *et al.* 2011).

I geni sono stati quindi suddivisi in gruppi in base ai processi biologici in cui sono coinvolti, ed ordinati in tabelle secondo il contenuto di geni significativamente modulati.

9.19.4 DIAGRAMMI DI VENN

Per confrontare ed identificare il grado di sovrapposizione in termini di espressione genica, tra i vari composti studiati, sono stati “costruiti” dei diagrammi di Venn (Chow *et al.* 2005). Questi diagrammi mostrano il numero di geni alterati dall'esposizione ad ogni molecola, in base all'entità della modulazione (*fold change*) e a diversi gradi di restrizione (valori di p) applicata. Le zone di sovrapposizione identificano il numero di geni che vengono alterati in comune con l'esposizione al BaP, o tra i vari *phytochemicals* utilizzati.

I geni in comune modulati dai composti in studio e dal BaP, almeno di 4 volte rispetto ai controlli e con $p < 0.001$ sono stati identificati singolarmente.

CAPITOLO 10

RISULTATI

10.1 PRIMA FASE DELLO STUDIO

10.1.1 CONTENUTO DI GLUCOSINOLATI NELL'ESTRATTO DI GERMOGLI DI CAVOLO NERO TOSCANO

La Tabella 10.1 riporta il contenuto di GLS del primo estratto utilizzato, e la Figura 10.1 il cromatogramma ottenuto dall'analisi HPLC. Dai germogli è stata ottenuta una polvere fine contenente il 13.3 % p/p di GLS totali. I GLS maggiormente presenti nell'estratto sono risultati la GRA e GER, rispettivamente il 70 % e il 21 % dei GLS totali. Inoltre TBCSE è risultato essere privo del GLS goitrogenici come la proigoitrina e sinigrina, in accordo con i risultati riportati recentemente da Sasaki *et al.* (Sasaki *et al.* 2012), dall'analisi di diversi *cultivars* di cavolo nero italiano. Inoltre, solo una quantità limitata di GLS indolici, pari allo 0.16 % p/p di 4-OH-glucobrassicina (4OH-GBS), 0.05 % p/p glucobrassicina (GBS), 0.42 % p/p 4-methoxy-glucobrassicina (4OM-GBS) e 0.36 % p/p neo-glucobrassicina (NEOGBS) sono stati identificata. In particolare, la quantità di NEOGBS presente nell'estratto, che è un potente mutageno, è risultata essere molto limitata (2.7 % dei GLS totali).

Questi risultati, mostrano inoltre come i germogli di cavolo nero toscano, grazie alla procedura (Abdull Razis *et al.* 2010) sviluppata presso il CRA-CIN di Bologna, siano una fonte ideale, altamente efficiente per estrarre GLS.

10.1.2 DETERMINAZIONE DEGLI ISOTIOCIANATI NELL'ESTRATTO DI GERMOGLI DI CAVOLO NERO TOSCANO DOPO INCUBAZIONE CON MIROSINASI

In seguito all'incubazione con enzima MYR esogeno, tutti i GLS presenti nel TBCSE sono stati idrolizzati, e i risultanti ITC sono stati identificati e quantificati. Sono stati determinati principalmente due ITC: erucina (ER) e SFN (Figura 10.2), confermando così la presenza dei precursori GRA e GER nell'estratto. I risultati dell'analisi hanno mostrato la presenza di 3.3 ± 0.1 $\mu\text{mol/mL}$ di ITC totali, dimostrando la conversione totale dei GLS presenti nell'estratto (3.3 ± 0.1 $\mu\text{mol/mL}$). Solamente i GLS alifatici (GRA e GER) presenti nell'estratto hanno contribuito alla produzione di ITC, infatti, i restanti GLS indolici vengono idrolizzati ad ITC altamente instabili, che vengono poi trasformati spontaneamente.

10.1.3 EFFETTI DELLA SOMMINISTRAZIONE DELL'ESTRATTO DI GERMOGLI DI CAVOLO NERO TOSCANO SUL PESO CORPOREO ED EPATICO DEI RATTI

Durante tutta la durata dell'esperimento i ratti sono rimasti in buona salute, e non sono state registrate differenze significative riguardanti variazioni del peso corporeo e del fegato tra i diversi gruppi di trattamento e il controllo (dati non riportati).

10.1.4 EFFETTI DELL'ESTRATTO DI GERMOGLI DI CAVOLO NERO TOSCANO SUL SISTEMA MONOSSIGENASICO P450-DIPENDENTE

La tabella 10.2 riporta il contenuto totale di citocromo P450 e i valori delle attività specifiche di diverse isoforme di CYP analizzate in microsomi epatici di ratto maschio, in seguito alla somministrazione di TBCSE.

In generale, la supplementazione dell'estratto ha determinato una moderata modulazione della maggior parte delle isoforme del sistema monoossigenasico P450-dipendente. Dallo studio delle diverse attività enzimatiche, risulta evidente come prevalga un significativo effetto di inattivazione per tutti i gruppi sperimentali (Grafico 10.1). Gli effetti più significativi sono stati osservati per il contenuto di CYP450 (con una diminuzione fino al 36 % nel gruppo TBCSE *per os* MYR-, $p < 0.01$), per la NADPH-citocromo (P450)-c-reduttasi (diminuzione fino 26 % di attività specifica nel gruppo TBCSE *ip* MYR+, $p < 0.01$), e per le isoforme CYP1A1 (EROD) (riduzione fino al 23 % di attività specifica nel gruppo TBCSE *ip* MYR-, $p < 0.01$), e CYP2B1/2 (PROD) (riduzione fino al 21% di attività specifica, nel gruppo TBCSE *per os* MYR-, $p < 0.01$), rispetto al gruppo di controllo. Il trattamento ha inoltre inattivato moderatamente l'attività specifica mista CYP1A1/2, CYP2A, CYP2B, CYP2E1-dipendente (ECOD), così come quella del CYP1A2 (MROD), nel gruppo TBCSE *ip* MYR- ($p < 0.01$), fino all'11 e 15 % circa, rispettivamente. Parallelamente, è stato inoltre osservato un leggero aumento significativo (fino al 10 %) per l'attività specifica dell'isoforma CYP2E1 (pNH) nel gruppo TBCSE *per os* MYR+ ($p < 0.05$), e per CYP3A1/2 (APND) ($p < 0.01$) in tutti i gruppi sperimentali, tranne che nel gruppo TBCSE *per os* MYR-. Nel gruppo TBCSE *per os* MYR+ l'attività specifica dell'isoforma CYP1A2 (MROD) è stata inoltre aumentata significativamente fino 13 % ($p < 0.01$).

10.1.5 EFFETTI DELL'ESTRATTO DI GERMOGLI DI CAVOLO NERO TOSCANO SUGLI ENZIMI DI FASE II

Nella Tabella 10.3 sono riportati i valori di attività specifica degli enzimi di fase II studiati, GST e UDP-GT. Come mostrato nel Grafico 10.2, che riporta tali risultati espressi come variazione percentuale rispetto al controllo, il trattamento con TBCSE ha aumentato l'attività specifica di questi enzimi in tutti i gruppi sperimentali, tranne che nel gruppo TBCSE *ip* MYR-. Il trattamento con l'estratto per via orale senza aggiunta di MYR è

stato il più efficace ad aumentare l'attività specifica dell'UDP-GT, per cui si è osservato un aumento significativo fino al 107 % ($p<0.01$), rispetto al gruppo di controllo. Nei gruppi TBCSE *per os* MYR+ e *ip* MYR+, l'attività dell'UDP-GT è aumentata ulteriormente fino 60 % ($p<0.01$). Diversamente, nel gruppo TBCSE *ip* MYR-, l'attività della UDP-GT non ha mostrato differenze rispetto al controllo. Aumenti significativi sono stati anche registrati per l'attività specifica della GST nel gruppo TBCSE *per os* MYR- (29 %, $p<0.01$), *per os* MYR+ (27 %, $p<0.01$), e *ip* MYR+ (36 %, $p<0.01$). Nel gruppo TBCSE *ip* MYR-, anche l'attività della GST non è stata influenzata significativamente dal trattamento.

10.1.6 EFFETTI DELL'ESTRATTO DI GERMOGLI DI CAVOLO NERO TOSCANO SUGLI ENZIMI ANTIOSSIDANTI

La Tabella 10.4 riporta i valori di attività specifiche degli enzimi antiossidanti studiati. CAT e NQO1 sono stati gli enzimi maggiormente influenzati dall'estratto. Come mostrato nel Grafico 10.3, tutti i trattamenti hanno provocato un'induzione significativa della CAT: TBCSE *per os* MYR- (fino al 33 %, $p<0.01$), TBCSE *ip* MYR- (fino al 38 %, $p<0.01$), TBCSE *per os* MYR+ (fino al 21 %, $p<0.01$), TBCSE *ip* MYR+ (fino al 35 %, $p<0.01$). Un aumento fino al 70 % ($p<0.01$) e 37 % ($p<0.01$) per l'attività specifica della NQO1 è stato osservato nel gruppo TBCSE *ip* MYR+, e nel TBCSE *per os* MYR+, rispettivamente. Induzioni significative sono state anche registrate nel gruppo TBCSE *ip* MYR- (fino 27 %, $p<0.01$), e nel TBCSE *per os* MYR- (fino al 18 %, $p<0.05$). L'attività della GSSG-red è stata indotta moderatamente in tutti i tipi di trattamento, così come per l'attività della GSH-px nel gruppo TBCSE *per os* MYR- (fino al 10 %, $p<0.05$). Inoltre, è stata osservata una lieve diminuzione dell'attività specifica della GSH-px nel gruppo TBCSE *ip* MYR- (fino all'11 %, $p<0.01$) e nel gruppo TBCSE *ip* MYR+ (fino al 16 %, $p<0.01$).

10.1.7 EFFETTI DELL'ESTRATTO DI GERMOGLI DI CAVOLO NERO TOSCANO SUI PRINCIPALI PARAMETRI EMATOCHIMICI

Le analisi dei parametri ematochimici analizzati, non hanno evidenziato alterazioni significative dei livelli di glucosio, creatinina, albumina totale, ALT, nei gruppi di trattamento rispetto al controllo. Diversamente è stata osservata una lieve ma significativa diminuzione del livello di TC principalmente nel gruppo TBCSE *per os* MYR- (12 %, $p < 0.05$), e dei TRGs nei gruppi TBCSE *per os* MYR- (23 %, $p < 0.05$), e nel TBCSE *ip* MYR+ (12 %, $p < 0.05$).

10.2 SECONDA FASE DELLO STUDIO

10.2.1 CONTENUTO DI GLUCOSINOLATI NELL'ESTRATTO DI GERMOGLI DI CAVOLO NERO TOSCANO

La Tabella 10.5 riporta il contenuto di GLS nel secondo estratto utilizzato. Il prodotto finale è risultato essere altamente ricco di GLS (13.7 % p/p), soprattutto per quanto riguarda i due GLS alifatici GRA (8.1 % p/p) e GER (4.1 % p/p), che rappresentano circa l'89 % dei GLS totali presenti. Inoltre, la 4-OH-glucobrassicina (4OH-GBS) (0.7 % p/p), la glucobrassicina (GBS) (0.1 % p/p), la 4-methoxy-glucobrassicina (4OM-GBS) (0.4 % p/p), e la neo-glucobrassicina (NEOGBS) (0.3 % p/p) sono risultati presenti nell'estratto. Inoltre TBCSE è risultato essere privo dei GLS goitrogenici progoitrina e sinigrina.

10.2.2 DETERMINAZIONE DEGLI ITC NELL'ESTRATTO DI GERMOGLI DI CAVOLO NERO TOSCANO DOPO INCUBAZIONE CON MIROSINASI

Come descritto precedentemente nei risultati del primo esperimento, in seguito ad incubazione con enzima MYR esogeno, tutti i GLS presenti in TBCSE sono stati idrolizzati, e i risultanti ITC sono stati identificati e quantificati, confermando così la presenza dei precursori GRA e GER nell'estratto.

10.2.3 PESO CORPOREO, PESO DEL FEGATO E CONSUMO DI CIBO

Come indicato nella Tabella 10.6 e mostrato nel Grafico 10.4, nel gruppo HFD è stato osservato un aumento significativo del peso corporeo e del fegato rispetto al gruppo RD ($p < 0.01$). La somministrazione orale di TBCSE nei ratti ha diminuito il peso corporeo rispetto al gruppo HFD. Alla dose di 15 mg/kg p.c., sia in presenza che in assenza di MYR, l'estratto è stato in grado di contrastare significativamente l'aumento di peso corporeo (fino a circa l'11 %, $p < 0.01$) causato dalla dieta iperlipidica. Dopo 21 giorni di trattamento, anche il peso del fegato è risultato diminuito rispetto al gruppo HFD, con una riduzione statisticamente significativa da parte del dosaggio minore dell'estratto con MYR (fino al 20 %, $p < 0.01$). L'assunzione di cibo è risultata significativamente ridotta nel gruppo HFD rispetto al gruppo di controllo RD ($p < 0.01$), così come nei gruppi HFD+TBCSE MYR- (150 mg/kg p.c.), e HFD+TBCSE MYR+ (15 mg/kg p.c.), dove è stata osservata una modesta, seppur significativa, riduzione dell'assunzione di cibo ($p < 0.01$).

10.2.4 PROFILO LIPIDICO SIERICO

Come indicato nella Tabella 10.7 e nei Grafici 10.5, 10.6 e 10.7, la dieta HFD ha aumentato significativamente i valori di TC ($p<0.05$), TGs ($p<0.05$), e NEFA ($p<0.01$). Contrariamente, la somministrazione dell'estratto ha provocato una riduzione di questi parametri verso i livelli basali. Il trattamento con 15 mg/kg p.c. TBCSE MYR- ha significativamente ridotto il TC (fino al 18 %, $p<0.01$) e i TGRs (fino al 25 %, $p<0.05$) alla dose di 150 mg/kg p.c., mentre i NEFA sono stati ridotti da entrambi i dosaggi dell'estratto in assenza di MYR (fino al 25 %, $p<0.01$), e dal dosaggio minore in presenza di MYR (fino al 19 %, $p<0.05$).

10.2.5 EFFETTI DELL'ESTRATTO DI GERMOGLI DI CAVOLO NERO TOSCANO SUGLI ENZIMI ANTIOSSIDANTI

Come indicato nella Tabella 10.8, nel gruppo HFD si è verificata una riduzione significativa dell'attività di tutti gli enzimi antiossidanti analizzati rispetto ai controlli ($p<0.01$), tranne che per la GSH-px. L'effetto dell'estratto, in generale, e nella maggior parte dei casi, è stato quello di ripristinare verso i valori normali l'attività degli enzimi antiossidanti diminuita dalla dieta iperlipidica (Grafico 10.8). L'attività della CAT è risultata significativamente superiore, fino al 22.4 % ($p<0.01$), nel gruppo HFD+TBCSE MYR+ (15 mg/kg p.c.). Un aumento significativo dell'attività specifica della NQO1 è stato osservato per il trattamento con dose maggiore senza MYR (fino al 141.7 %, $p<0.01$), e con MYR (fino al 33.5 %, $p<0.01$). Il dosaggio minore senza MYR ha inoltre provocato un aumento dell'attività della NQO1 (fino al 8.7 %, $p<0.01$). Una riduzione dell'attività della GSH-px (6.5 %, $p<0.05$) è stata registrata nel gruppo HFD+TBCSE MYR- (15 mg/kg p.c.), mentre induzioni significative si sono registrate nel gruppo HFD+TBCSE MYR+ fino al 14.2 % ($p<0.01$) per il dosaggio minore, e fino al 9.9 % ($p<0.01$) per il dosaggio maggiore. L'enzima GSSG-red è stato inoltre influenzato dal trattamento con TBCSE, per cui si è osservato un

aumento del 12.2 % ($p<0.01$) da parte del dosaggio maggiore senza MYR, e del 7.6 % ($p<0.01$) da parte del dosaggio minore con MYR. Nei gruppi HFD+TBCSE MYR- l'attività della SOD è stata indotta da entrambi i dosaggi: 15 mg/kg p.c fino al 16.0 % ($p<0.01$), e 150 mg/kg p.c fino al 47.0 % ($p<0.01$). Una riduzione dell'attività specifica della SOD (17.9 %, $p<0.05$) è stato osservato nel gruppo HFD+TBCSE MYR+ (150 mg/kg p.c.).

10.2.6 EFFETTI DELL'ESTRATTO DI GERMOGLI DI CAVOLO NERO TOSCANO SUGLI ENZIMI DI FASE II

Come indicato dalla Tabella 10.9, e mostrato nel Grafico 10.9, l'attività specifica degli enzimi di fase II studiati è risultata ridotta in modo significativo ($p<0.01$) nel gruppo HFD rispetto al gruppo RD. In seguito al trattamento con l'estratto si è registrato un comune *trend* induttivo dell'attività della GST e dell'UDP-GT verso il livello dei controlli. TBCSE MYR- a 150 mg/kg p.c. ha indotto l'attività della GST fino al 11.9 % ($p<0.01$), mentre il trattamento con MYR a 15 mg/kg p.c. fino al 6.7 % ($p<0.05$). L'UDPGT è stata indotta dalla somministrazione dell'estratto in modo dose-dipendente: fino al 17.4 % ($p<0.05$) da TBCSE MYR- al dosaggio minore, e fino al 56.2 % ($p<0.01$) dal dosaggio maggiore, mentre TBCSE MYR+ ha aumentato tale attività fino al 52.6 % ($p<0.01$) a 15 mg/kg p.c., e fino al 72.3 % ($p<0.01$) a 150 mg/kg p.c..

10.3 PARTE SPERIMENTALE SVOLTA ALL'ESTERO

10.3.1 CITOTOSSICITÀ

In seguito all'esposizione degli epatociti con GRA e BaP è stato osservato solo un moderato calo della vitalità cellulare, considerando un ampio *range* di concentrazioni: 0.006-200 μM e 0.090-300 μM , rispettivamente (Grafico

10.10 e 10.11). L'esposizione con SFN ha provocato invece una forte riduzione della vitalità cellulare alla concentrazione di circa 50 μM , mentre fino alla concentrazione di circa 9 μM , non si è osservata diminuzione della vitalità cellulare (Grafico 10.12). L'esposizione con I3C non ha mostrato riduzione della vitalità fino alla concentrazione di 12.5 μM , mentre ha mostrato citotossicità vicina al 100 % alla concentrazione di 300 μM (Grafico 10.13). In seguito all'esposizione con DIM non si è registrata diminuzione della vitalità cellulare fino a 25 μM , mentre a 100 μM è stata indotta una forte citotossicità che ha ridotto totalmente la vitalità cellulare (Grafico 10.14).

Dai dati di vitalità cellulare ottenuti, mediante un'analisi statistica di regressione, è stata calcolata la concentrazione effettiva che provoca la perdita di vitalità cellulare del 20 % (EC20) per ogni molecola impiegata (Tabella 10.10) rispetto ai dati di vitalità delle cellule di controllo trattate con solvente, e considerate come 100 % di vitalità. Per gli studi successivi riguardanti *markers* di stress ossidativo e la modulazione dell'espressione genica, gli epatociti sono stati esposti alle rispettive EC20 determinate per ogni molecola in studio, mentre GRA e BaP sono stati impiegati a concentrazioni (relativamente elevate) pari a 50 μM .

10.3.2 SAGGIO DEI TBARS

Come mostrato nella Tabella 10.11 e nel Grafico 10.15, il saggio dei TBARS ha mostrato un aumento significativo della concentrazione di MDA di 1.3 volte negli epatociti esposti a SFN e GRA, e di 1.7 volte per DIM, mentre l'esposizione con I3C non ha rivelato aumenti significativi, rispetto al controllo.

10.3.3 STUDIO DELL'EPRESSIONE GENICA

10.3.3.1 ANALISI DELLE COMPONENTI PRINCIPALI

Per ottenere una rappresentazione grafica e descrittiva del *pattern* di espressione genica dovuto all'esposizione degli eapatociti con i composti in studio, è stata effettuata una PCA. Da questa rappresentazione matematica si può notare inizialmente nel Grafico 10.16 (sinistra) diversi *spots* che rappresentano i quaranta campioni totali (esposti e controlli). Questa rappresentazione dei dati non permette tuttavia di identificare con chiarezza l'effetto dei singoli composti impiegati. In questa parte del grafico (sinistra) sembrerebbe che i 4 campioni esposti al SFN (punti rossi) e quelli esposti al DIM (punti verdi) siano ben raggruppati tra loro e ben separati in due regioni del grafico diverse, mentre gli altri punti che rappresentano il *pattern* di espressione dovuta all'esposizione con altre molecole non risultano ben separati l'uno con l'altro, e non risulta quindi possibile identificare l'effetto dell'esposizione. Nella parte destra, si può notare come ci sia un effetto dovuto alla variabilità biologica e tecnica: gli *spots* dello stesso colore, derivati da cellule ottenute dallo stesso animale nello stesso giorno, tendono a raggrupparsi insieme, e in zone diverse del grafico rispetto ad altri replicati biologici, confondendo l'effetto delle molecole. Per esempio, punti vicini nel grafico sembrerebbero avere un simile profilo di espressione genica, ma ciò rappresenta un *bias* dovuto alla variabilità sperimentale.

Per rimuovere questa variabilità, sono stati sottratti i valori dei rispettivi controlli (Grafico 10.17, sinistra), e l'effetto dei singoli composti, che non risultava visibile senza questa normalizzazione, viene messo così in risalto: si ottiene un raggruppamento più definito e preciso dei campioni trattati con lo stesso composto. I campioni trattati con SFN e DIM si separano chiaramente tra loro in due gruppi, mostrando così un profilo di espressione genica diverso, così come dagli altri gruppi che invece tendono a raggrupparsi in una regione comune del grafico (in alto a destra),

suggerendo una possibile sovrapposizione del pattern di espressione genica. Nella parte destra, dove è stato rimosso il *batch effect* si può notare in fine che il profilo di espressione genica risulta simile in seguito l'esposizione alla stessa molecola nei diversi replicati biologici. In questo modo l'effetto registrato è frutto solamente dal trattamento e non influenzato dalla variabilità di diversi sistemi sperimentali.

10.3.3.2 HEATMAP

L'analisi gerarchica di raggruppamento (*heatmap*), basata sui 100 geni più significativi, mostra una buona separazione del profilo di espressione genica, in base ai *phytochemicals* a cui sono stati esposti gli epatociti (Figura 10.3).

Si possono notare due *clusters* principali, caratterizzati da un comune *pattern* di espressione genica: tra SFN e DIM, e tra BaP, I3C e GRA, con una parziale sovrapposizione tra il profilo di GRA e I3C. L'*heatmap* mostra che l'esposizione con SFN e DIM ha provocato principalmente un aumento dell'espressione genica, scala di colori rossi, e molte aree con lo stesso profilo di espressione genica tra i due composti. Nel gruppo formato da BaP, I3C e GRA prevale invece una deregolazione dell'espressione genica (scala di colori gialli), ma possono essere anche individuate aree rosse, che risultano, in molti casi, analoghe alle aree di aumento dell'espressione genica provocate da SFN e DIM, soprattutto nella parte superiore ed inferiore dell'*heatmap*, e principalmente riguardante BaP e I3C.

10.3.3.3 ANALISI DELL'ONTOLOGIA GENICA

Per ogni composto utilizzato sono state determinate le 100 categorie funzionali statisticamente più significative.

Le classi funzionali più significative, dovute all'esposizione con SFN hanno riguardato (Tabella 10.12) principalmente: la catena respiratoria mitocondriale (GO.ID 1), contenente 14 geni modulati significativamente;

reazioni coinvolte nel metabolismo degli aminoacidi (GO.ID 3, 10, 11) in cui si sono osservati 69, 8 e 8 geni modulati rispettivamente; reazioni coinvolte nel metabolismo di composti solforati (GO.ID 5) con 52 geni significativi; la beta ossidazione (GO.ID 6) con 49 geni significativi; reazioni coinvolte nel metabolismo degli xenobiotici (GO.ID 48) con 29 geni significativi; eliminazione di cellule apoptotiche (GO.ID 8) con 23 geni significativi; riparazione del DNA (GO.ID 13) con 8 geni significativi; riparazione di basi per escissione (GO.ID 18) con 24 geni significativi.

Il 9 % delle categorie funzionali modulate dal SFN, sono risultate essere in comune con quelle modulate dal BaP, come per esempio la classe coinvolta nel metabolismo degli xenobiotici e dei farmaci, degli aminoacidi, nel tRNA *processing*; il 13 % in comune con quelle modulate da DIM, tra cui la classe coinvolta nel metabolismo degli aminoacidi, nella beta ossidazione e nel metabolismo degli xenobiotici.

Le classi funzionali più significative (Tabella 10.13), dovute alla modulazione dell'espressione genica da parte di DIM, sono risultate quelle contenenti geni coinvolti: nel metabolismo del GSH (GO.ID 1) con 34 geni significativi; nello sviluppo epatico (GO.ID 2) con 89 geni significativi; in processi ossidoreduuttivi (GO.ID 3) con 222 geni significativi; nel metabolismo di aminoacidi (GO.ID 7) con 67 geni significativi; nel metabolismo degli xenobiotici (GO.ID 13 e 64) con 13 e 29 geni significativi, rispettivamente; in risposte ai danni al DNA (GO.ID 49) con 16 geni significativi; nel rilascio di citocromo c mitocondriale (GO.ID 67) con 31 geni significativi; nella morte cellulare necrotica (GO.ID 93) con 16 geni significativi; nella risposta e regolazione dello stress ossidativo (GO.ID 89 e 96) con 162 e 20 geni significativi, rispettivamente. Il 25 % di queste categorie contenenti geni modulati significativamente da DIM, sono state modulate anche dall'esposizione a BaP, tra le quali, quelle relative ai processi metabolici del GSH, allo sviluppo epatico, al metabolismo di farmaci e xenobiotici, e alla risposta verso lo stress ossidativo. Il 15 % delle classi GO sono risultate sovrapposte a quelle modulate dall'I3C, come quelle relative ai processi ossidoreduuttivi, al metabolismo di aminoacidi e di

lipidi, e il 12 % a quelle modulate dal SFN, e principalmente coinvolte nel metabolismo dei farmaci e degli xenobiotici.

Le classi funzionali modulate in modo più significativo da I3C (Tabella 10.14) sono state quelle relative: all'ubiquitazione proteica (GO:ID 1, 5, 9, 15, 18); al controllo del ciclo cellulare (GO:ID 6, 11, 54, 67, 77, 83); ai processi ossidoreduuttivi (GO:ID 34); al controllo della fissione mitocondriale (OG:ID 27); ai processi coinvolti nella riparazione del DNA (GO:ID 50), e nel metabolismo dei farmaci (GO:ID 17). Il 15 % delle classi GO significative è risultata in comune a quelle regolate da BaP, e principalmente per quanto riguarda i processi ossidoreduuttivi e l'*mRNA processing*; il 10 % e il 13 % con quelle modulate dal SFN e DIM, rispettivamente, coinvolte nel metabolismo degli aminoacidi e dei lipidi, maggiormente.

I geni modulati in modo più significativo dall'esposizione con GRA (Tabella 10.15) appartengono a classi funzionali riguardanti per esempio la regolazione ed organizzazione di strutture cellulari come le giunzioni cellulari (GO:ID 1 e 9), i microtubuli (OG:ID 7), il reticolo endoplasmatico (GO:ID 3), la regolazione negativa dei processi apoptotici (OG:ID 15, 16, 38), risposte a danni al DNA (OG:ID 64, 94), e il metabolismo dei farmaci (OG:ID 30, 76). Un numero limitato di classi funzionali significative è risultata in comune con gli altri composti utilizzati, e principalmente comprendenti geni coinvolti nel metabolismo dei farmaci.

Le classi funzionali modulate dall'esposizione al BaP (Tabella 10.16) riguardano principalmente: il catabolismo degli aminoacidi (OG:ID 1) e di composti aromatici (OG:ID 3) contenenti rispettivamente 59 e 20 geni significativi; il metabolismo degli xenobiotici (OG:ID 5) contenenti 24 geni significativi; il metabolismo del GSH (OG:ID 13) con 20 geni significativi; il metabolismo lipidico (OG:ID 8, 11, 20 e 27); i processi ossidoreduuttivi (OG:ID 67) con 172 geni significativi; la frammentazione mitocondriale correlata con l'apoptosi (OG:ID 71).

10.3.3.4 PRINCIPALI GENI MODULATI

Il SFN si è dimostrato il *phytochemical* più attivo nel modulare l'espressione genica: 15239 geni sono risultati significativamente ($p < 0.05$) influenzati di almeno una volta (*fold change*, FC). Numerosi geni hanno subito alterazioni significative superiori a 4 volte, ed alcuni anche fino a 9 volte. Tra questi geni sono stati identificati per esempio: CYP1a2 e CYP2c7, alterati di 5 e 4 volte rispettivamente ($p < 0.01$); la *dermatopontin*, di 8 volte ($p < 0.01$); geni per proteine istoniche, come l'*histone cluster 2* e l'*H2A histone family* di 7 e 4 volte rispettivamente ($p < 0.01$); la metalloproteasi di matrice, di quasi 10 volte ($p < 0.01$); l'*apoptin-associating protein 1* e geni per membri della famiglia delle aldochetoreduccasi, di 4 volte ($p < 0.05$); geni per proteine del complemento e chemochine più di 4 volte ($p < 0.01$).

Il DIM ha alterato significativamente ($p < 0.05$) 9254 geni di almeno 1 FC.

Numerosi geni hanno subito alterazioni significative fino a 4 volte, e alcuni anche superiori: 7 volte come la NQ01 ($p < 0.001$); 4 volte come la metalloproteasi di matrice ($p < 0.005$); fino a 10 volte come il CYP1a1 e l'aldochetoreduccasi ($p < 0.01$); fino a 5 volte come il CYP26b1 ($p < 0.005$).

L'I3C ha provocato l'alterazione significativa ($p < 0.05$) di almeno 1 FC in 4966 geni, e un numero limitato di geni con alterazione superiore a 2 FC.

La GRA si è dimostrato il composto più debole nel modulare l'espressione genica: 2178 geni sono risultati significativamente ($p < 0.05$) influenzati di almeno 1 FC, e nessun gene ha superato le 2 FC per ogni livello di restrizione.

10.3.3.5 DIAGRAMMI DI VENN

Nel Grafico 10.18 si può notare un elevato numero di geni, pari a 15239, con FC=1 ed influenzati significativamente ($p < 0.05$) dall'esposizione al SFN. Tra questi, 4480 geni (circa il 30 %) risultano sovrapposti a quelli

influenzati dal BaP. Aumentando il grado di restrizione e di FC considerato, si può notare come il numero di geni significativi diminuisca.

Il numero di geni significativi ($p < 0.05$) influenzati da SFN in base a FC sono stati: 3042 modulati di 2 volte, tra cui 210 (7 %) in comune a quelli alterati dal BaP; 992 modulati di 3 volte, tra cui 33 (3 %) in comune con BaP; 455 modulati di 4 volte, tra cui 17 (4 %) in comune con BaP. Anche considerando la massima restrizione ($p < 0.001$, $FC=4$) il numero di geni significativi è rimasto il medesimo, e tra quelli in comune con BaP sono stati identificati: la diidropirimidina deidrogenasi, che codifica per un enzima coinvolto nel catabolismo di basi pirimidiniche; la fosfofruttochinasi 2, coinvolta nel metabolismo glucidico epatico; la sulfotransferasi 1A1, enzima coinvolta nel metabolismo degli xenobiotici; la carbamoil fosfato sintetasi, coinvolta nel ciclo dell'urea; il CYP1a1, coinvolto nell'attivazione metabolica degli idrocarburi policiclici aromatici; l'idrossimetilglutaril-CoA sintasi, enzima mitocondriale coinvolto nella chetogenesi; l'aldo-cheto reductasi, coinvolto nella riduzione di aldeidi alifatiche ed aromatiche; l'acyl-CoA oxidase 2; il fosfoenolpiruvato carbossichinasi, coinvolto nella gluconeogenesi; il CYP1a2, coinvolto nel metabolismo degli idrocarburi policiclici aromatici e farmaci come paracetamolo; il *TP53 dependent G2 arrest mediator candidate*, induttore dell'arresto del ciclo cellulare.

Il Grafico 10.19 mostra il numero di geni (9254) con $FC=1$, modulati significativamente ($p < 0.05$) dall'esposizione a DIM. Tra questi, 3701 geni (circa il 40 %) risultano sovrapposti a quelli influenzati dal BaP. Aumentando il grado di restrizione e di FC considerato, si può notare come il numero di geni significativi diminuisca.

Il numero di geni significativi ($p < 0.05$) influenzati da DIM in base a FC sono stati: 1731 modulati di 2 volte, tra cui 210 (12 %) in comune a quelli alterati dal BaP; 511 modulati di 3 volte, tra cui 63 (12 %) in comune con BaP; 243 modulati di 4 volte, tra cui 31 (12 %) in comune con BaP. Considerando la massima restrizione ($p < 0.001$, $FC=4$), 30 geni sono risultati in comune a quelli influenzati dal BaP come: il CYP2e1, coinvolto nel metabolismo di etanolo e alcuni farmaci; la diidropirimidina deidrogenasi,

che codifica per un enzima coinvolto nel catabolismo di basi pirimidiniche; la glutatione transferasi, che catalizza la coniugazione del GSH con substrati da eliminare; la fosfofruttochinasi 2, coinvolta nel metabolismo glucidico epatico; la sulfotransferasi 1A1, coinvolta nel metabolismo degli xenobiotici; la carbamoil fosfato sintetasi, coinvolta nel ciclo dell'urea; il CYP1a1, coinvolto nell'attivazione metabolica degli idrocarburi policiclici aromatici; l'idrossimetilglutaril-CoA sintasi, enzima mitocondriale coinvolto nella chetogenesi; l'aldo-cheto reduttasi, coinvolto nella riduzione di aldeidi alifatiche ed aromatiche; la *sestrin* 1, che gioca un ruolo nella risposta cellulare al danno al DNA e nello stress ossidativo; la glucosio-6-fosfatasi, coinvolta nel metabolismo glucidico; la NADP(H): chinone ossidoreduttasi 1 (NQO1), ossido reduttasi coinvolta nella riduzione dei chinoni e nelle reazioni di detossificazione; il CYP4f4, coinvolto nel metabolismo degli xenobiotici; il *TP53 dependent G2 arrest mediator candidate*, induttore dell'arresto del ciclo cellulare.

Il Grafico 10.20 mostra il numero di geni (4966) con FC=1, modulati significativamente ($p<0.05$) dall'esposizione a I3C. Tra questi, 2325 geni (circa il 47 %) risultano sovrapposti a quelli influenzati dal BaP. Aumentando il grado di restrizione e di FC considerato, si può notare come il numero di geni significativi diminuisca, soprattutto considerando valori di FC superiori o pari a 3.

Il numero di geni significativi ($p<0.05$) influenzati da I3C in base a FC sono stati: 146 modulati di 2 volte, tra cui 49 (33 %) in comune a quelli alterati dal BaP; 9 modulati di 3 volte, tra cui 2 (22 %) in comune con BaP; 4 modulati di 4 volte, tra cui solo un gene in comune con BaP, anche con massima restrizione ($p<0.001$, FC=4), la diidropirimidina deidrogenasi, che codifica per un enzima coinvolto nel catabolismo di basi pirimidiniche.

Il Grafico 10.21 mostra il numero di geni (2178) con FC=1, modulati significativamente ($p<0.05$) dall'esposizione a GRA. Tra questi, 666 geni (circa il 30 %) risultano sovrapposti a quelli influenzati dal BaP. L'esposizione a GRA no ha provocato alterazioni dell'espressione genica maggiori od uguali a 2 FC.

Il Grafico 10.22 mostra la sovrapposizione del numero di geni influenzati dalle diverse esposizioni. 214 geni risultano alterati significativamente ($p < 0.05$) in comune considerando $FC=1$. Aumentando la restrizione: 84 geni sono risultati sovrapposti tra SFN, DIM e I3C; considerando $FC=2$ e $p < 0.05$; 6 geni sono risultati sovrapposti tra SFN, DIM e I3C, considerando $FC=3$ e $p < 0.05$; un solo gene è risultato in comune tra SFN, DIM e I3C, considerando $FC=4$ e $p < 0.05$; mentre il maggior numero di geni sovrapposti si è osservato tra l'esposizione con SFN e DIM, anche alla massima restrizione ($FC=4$ e $p < 0.001$) con 102 geni significativi.

TABELLA 10.1. CONTENUTO DI GLUCOSINOLATI NELL'ESTRATTO DI GERMOGLI DI CAVOLO NERO TOSCANO

| glucosinolati | $\mu\text{mol g}^{-1}$ | mg g^{-1} | % p/p |
|--|--|--------------------------------------|-----------------|
| glucoiberina (GIB) | 4.33 \pm 0.02 | 2.01 | 0.20 \pm 0.01 |
| glucorafanina (GRA) | 196.01 \pm 11.01 | 93.01 | 9.30 \pm 0.50 |
| 4-OH-glucobrassicina (4OH-GBS) | 3.18 \pm 0.04 | 1.60 | 0.16 \pm 0.02 |
| glucoerucina (GER) | 61.01 \pm 2.01 | 28.01 | 2.80 \pm 0.10 |
| glucobrassicina (GBS) | 1.01 \pm 0.04 | 0.49 | 0.05 \pm 0.01 |
| 4-methoxy-glucobrassicina (4OM-GBS) | 8.10 \pm 0.60 | 4.20 | 0.42 \pm 0.03 |
| neo-glucobrassicina (NEOGBS) | 7.00 \pm 0.40 | 3.60 | 0.36 \pm 0.02 |
| totale | 280.64 | 133 | 13.29 |

Ogni valore rappresenta la media \pm deviazione *standard* di tre determinazioni indipendenti tramite analisi HPLC.

FIGURA 10.1. CROMATOGRAMMA DELL'ANALISI HPLC DEL PROFILO DEI GLUCOSINOLATI PRESENTI NELL'ESTRATTO DI GERMOGLI DI CAVOLO NERO TOSCANO (TBCSE)

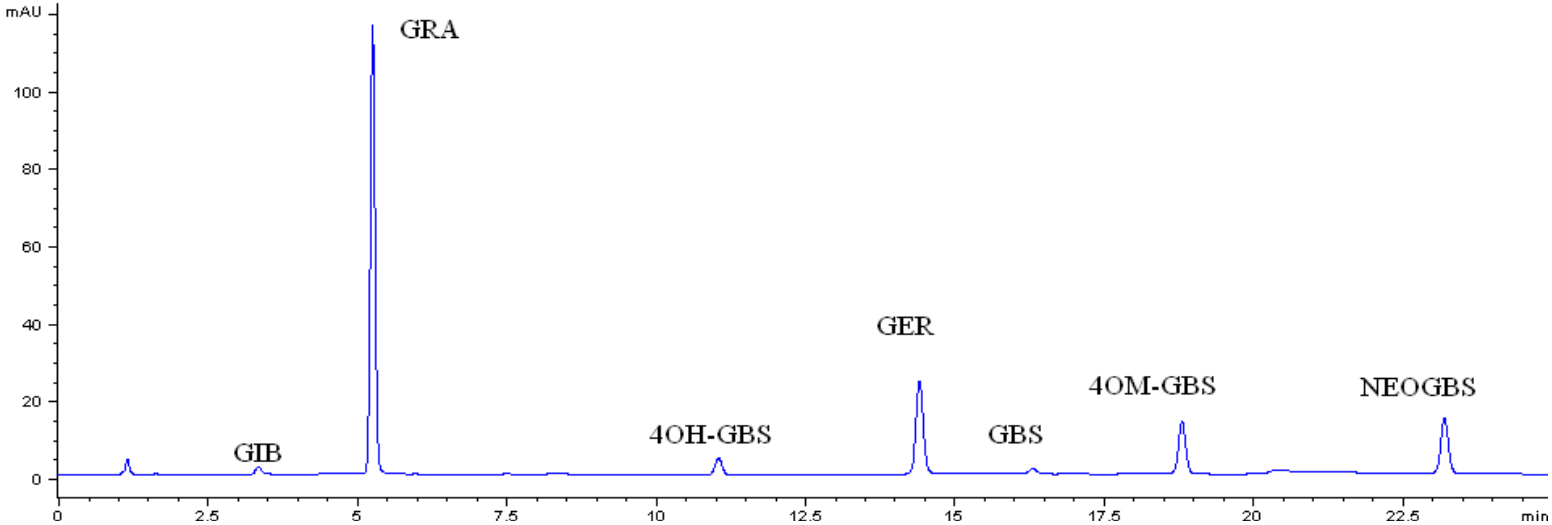


FIGURA 10.2. CROMATOGRAMMA DELL'ANALISI GC-MS DEGLI ISOTIOCIANATI PRESENTI NELL'ESTRATTO DI GERMOGLI DI CAVOLO NERO TOSCANO (TBCSE), DOPO INCUBAZIONE CON MIROSINASI ESOGENA

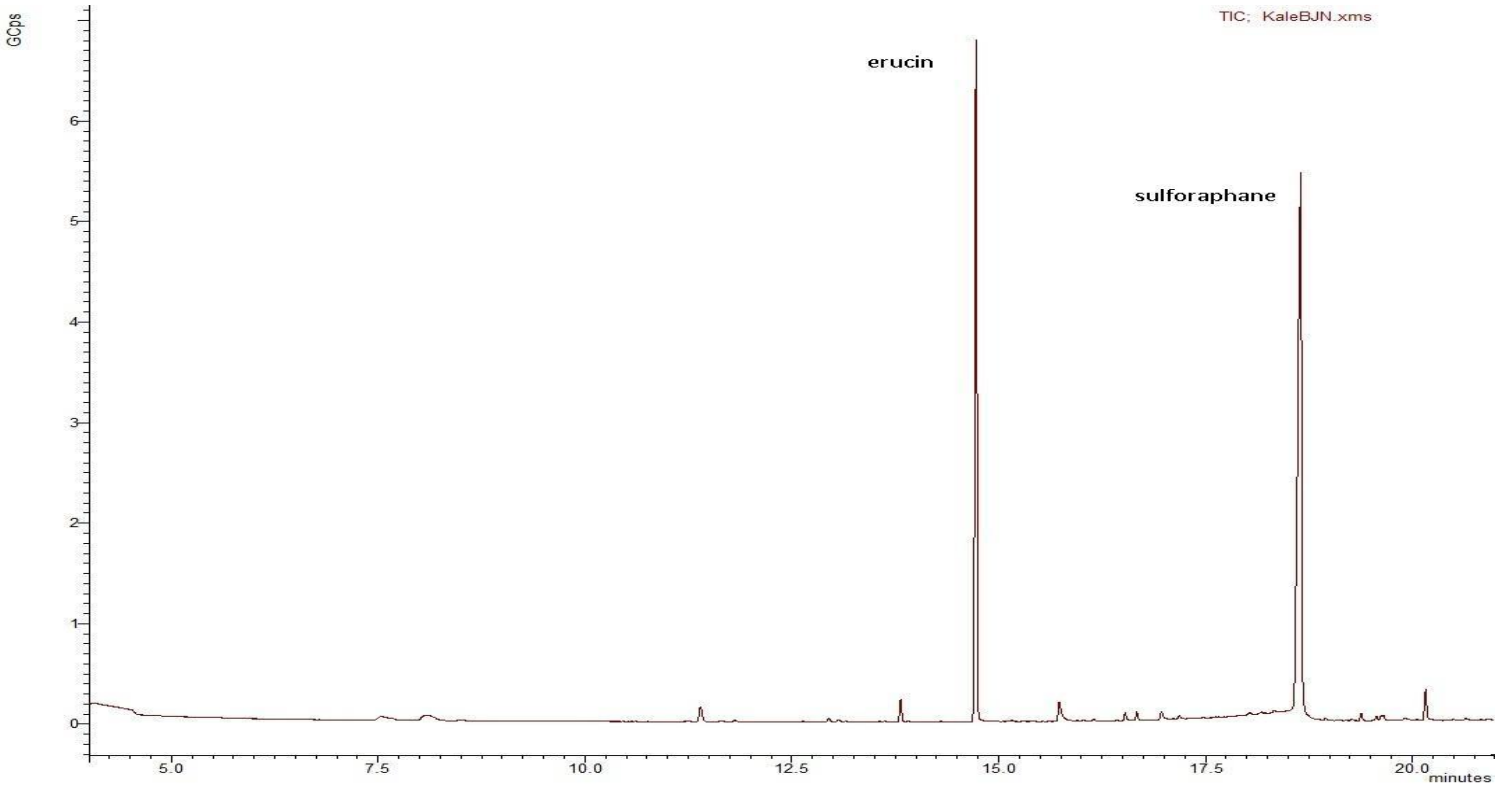


TABELLA 10.2. EFFETTI DELL'ESTRATTO DI GERMOGLI DI CAVOLO NERO TOSCANO (TBCSE) SUL SISTEMA MONOSSIGENASICO P450-DIPENDENTE IN MICROSOMI DI FEGATO DI RATTO

| parametri | controllo | TBCSE <i>per os</i> MYR- (15 mg/Kg p.c.) | TBCSE <i>ip</i> MYR- (15 mg/Kg p.c.) | TBCSE <i>per os</i> MYR+ (15 mg/Kg p.c.) | TBCSE <i>ip</i> MYR+ (15 mg/Kg p.c.) |
|--|-----------------|--|--|--|--|
| citocromo P450 (nmol x mg ⁻¹) | 0.455 ± 0.047 | 0.293 ± 0.061** | 0.385 ± 0.077 | 0.355 ± 0.039* | 0.335 ± 0.022** |
| NADPH-citocromo (P450)-c- reduttasi (nmol mg ⁻¹ min ⁻¹) | 67.285 ± 2.518 | 51.419±4.039** | 59.349 ± 8.810 | 63.729 ± 4.792 | 49.826 ± 2.428** |
| amminopirina N-demetilasi (CYP3A1/2) (nmol mg ⁻¹ min ⁻¹) | 8.445 ± 0.155 | 8.365 ± 0.667 | 9.107 ± 0.208** | 9.269 ± 0.001** | 9.234 ± 0.440** |
| p-nitrofenolo idrossilasi (CYP2E1) (nmol mg ⁻¹ min ⁻¹) | 1.529 ± 0.036 | 1.595 ± 0.045 | 1.577 ± 0.044 | 1.695 ± 0.074* | 1.579 ± 0.016 |
| pentossiresorufina O-dealchilasi (CYP2B1/2) (pmol mg ⁻¹ min ⁻¹) | 7.572 ± 0.514 | 5.978 ± 0.930** | 6.136 ± 0.818** | 7.118 ± 0.371 | 6.427 ± 0.476** |
| etossiresorufina O-deetilasi (CYP1A1) (pmol mg ⁻¹ min ⁻¹) | 25.564 ± 1.770 | 23.645 ± 0.971 | 19.697 ± 0.223** | 22.742 ± 0.741* | 22.309 ± 0.727* |
| metossiresorufina O-demetilasi (CYP1A2) (pmol mg ⁻¹ min ⁻¹) | 16.788 ± 0.314 | 15.774 ± 0.497* | 14.688 ± 0.816** | 18.980 ± 0.491** | 16.952 ± 0.963 |
| etossicumarina O-deetilasi (CYP1A1/2, CYP2A, CYP2B, CYP2E1)(pmol mg ⁻¹ min ⁻¹) | 138.598 ± 2.361 | 132.132 ± 4.132* | 124.024 ± 3.141** | 141.782 ± 1.410 | 127.463 ± 5.265** |

Ogni valore rappresenta la media ± deviazione *standard* di sei esperimenti indipendenti eseguiti su sei differenti animali. *= $p < 0.05$ e **= $p < 0.01$ rispetto al controllo, secondo il *rank method* di Wilcoxon.

TABELLA 10.3. EFFETTI DELL'ESTRATTO DI GERMOGLI DI CAVOLO NERO TOSCANO (TBCSE) SUGLI ENZIMI DI FASE II IN MICROSOMI DI FEGATO DI RATTO

| parametri | controllo | TBCSE <i>per os</i> MYR- (15 mg/Kg p.c.) | TBCSE <i>ip</i> MYR- (15 mg/Kg p.c.) | TBCSE <i>per os</i> MYR+ (15 mg/Kg p.c.) | TBCSE <i>ip</i> MYR+ (15 mg/Kg p.c.) |
|--|---------------|--|--|--|--|
| glutazione S-transferasi (nmol mg ⁻¹ min ⁻¹) | 2.161 ± 0.222 | 2.780 ± 0.219** | 2.277 ± 0.207 | 2.745 ± 0.217** | 2.938 ± 0.001** |
| UDP-glucoronil transferasi (nmol mg ⁻¹ min ⁻¹) | 1.683 ± 0.164 | 3.480 ± 0.297** | 1.899 ± 0.158 | 2.688 ± 0.045** | 2.713 ± 0.232** |

Ogni valore rappresenta la media ± deviazione *standard* di sei esperimenti indipendenti eseguiti su sei differenti animali.

*=p<0.05 e **=p<0.01 rispetto al controllo, secondo il *rank method* di Wilcoxon.

TABELLA 10.4. EFFETTI DELL'ESTRATTO DI GERMOGLI DI CAVOLO NERO TOSCANO (TBCSE) SUGLI ENZIMI ANTIOSSIDANTI NEL CITOSOL DI FEGATO DI RATTO

| parametri | controllo | TBCSE <i>per os</i> MYR- (15 mg/Kg p.c.) | TBCSE <i>ip</i> MYR- (15 mg/Kg p.c.) | TBCSE <i>per os</i> MYR+ (15 mg/Kg p.c.) | TBCSE <i>ip</i> MYR+ (15 mg/Kg p.c.) |
|---|----------------------|--|--|--|--|
| catalasi ($\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$) | 74.441 \pm 4.609 | 98.714 \pm 2.379** | 102.392 \pm 1.773** | 89.749 \pm 2.992** | 100.718 \pm 7.529** |
| NAD(P)H:chinone reduttasi ($\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$) | 18.827 \pm 1.092 | 22.220 \pm 2.494* | 24.029 \pm 0.001** | 25.806 \pm 2.501** | 31.989 \pm 2.158** |
| GSH-perossidasi ($\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$) | 358.646 \pm 12.575 | 393.431 \pm 23.999* | 320.568 \pm 10.481** | 355.067 \pm 11.101 | 299.567 \pm 2.813** |
| GSSG-reduttasi ($\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$) | 81.377 \pm 1.229 | 85.122 \pm 0.001** | 84.721 \pm 2.190* | 82.664 \pm 2.041 | 84.555 \pm 0.713** |

Ogni valore rappresenta la media \pm deviazione *standard* di sei esperimenti indipendenti eseguiti su sei differenti animali. *= $p < 0.05$ e **= $p < 0.01$ rispetto al controllo, secondo il *rank method* di Wilcoxon.

GRAFICO 10.1. VARIAZIONE PERCENTUALE DEL SISTEMA EPATICO MONOOSSIGENASICO P450-DIPENDENTE IN RATTI TRATTATI CON ESTRATTO DI GERMOGLI DI CAVOLO NERO TOSCANO (TBCSE)

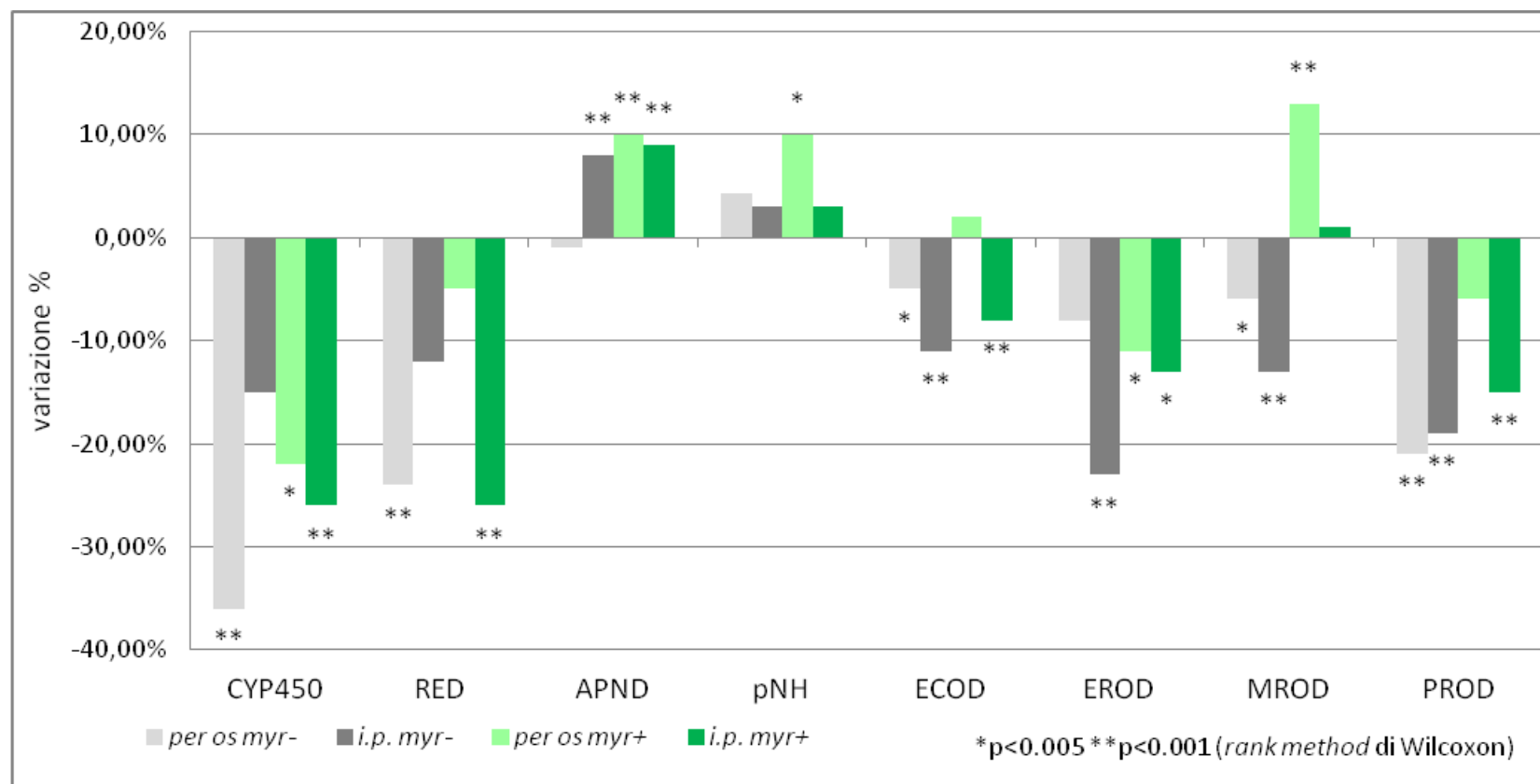


GRAFICO 10.2. VARIAZIONE PERCENTUALE DELL'ATTIVITÀ DEGLI ENZIMI EPATICI DI FASE II IN RATTI TRATTATI CON ESTRATTO DI GERMOGLI DI CAVOLO NERO TOSCANO (TBCSE)

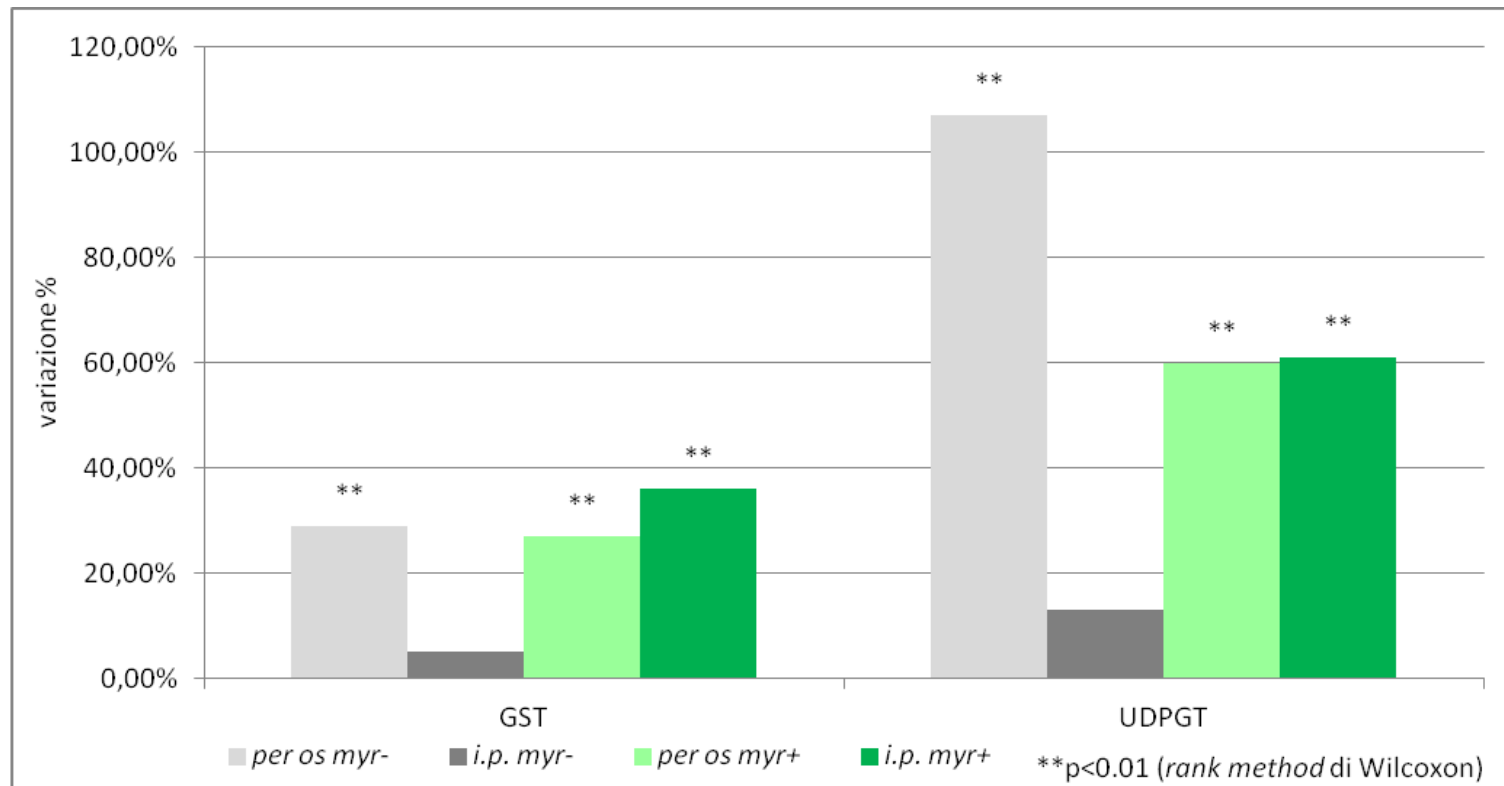


GRAFICO 10.3. VARIAZIONE PERCENTUALE DELL'ATTIVITÀ DEGLI ENZIMI EPATICI ANTIOSSIDANTI IN RATTI TRATTATI CON ESTRATTO DI GERMOGLI DI CAVOLO NERO TOSCANO (TBCSE)

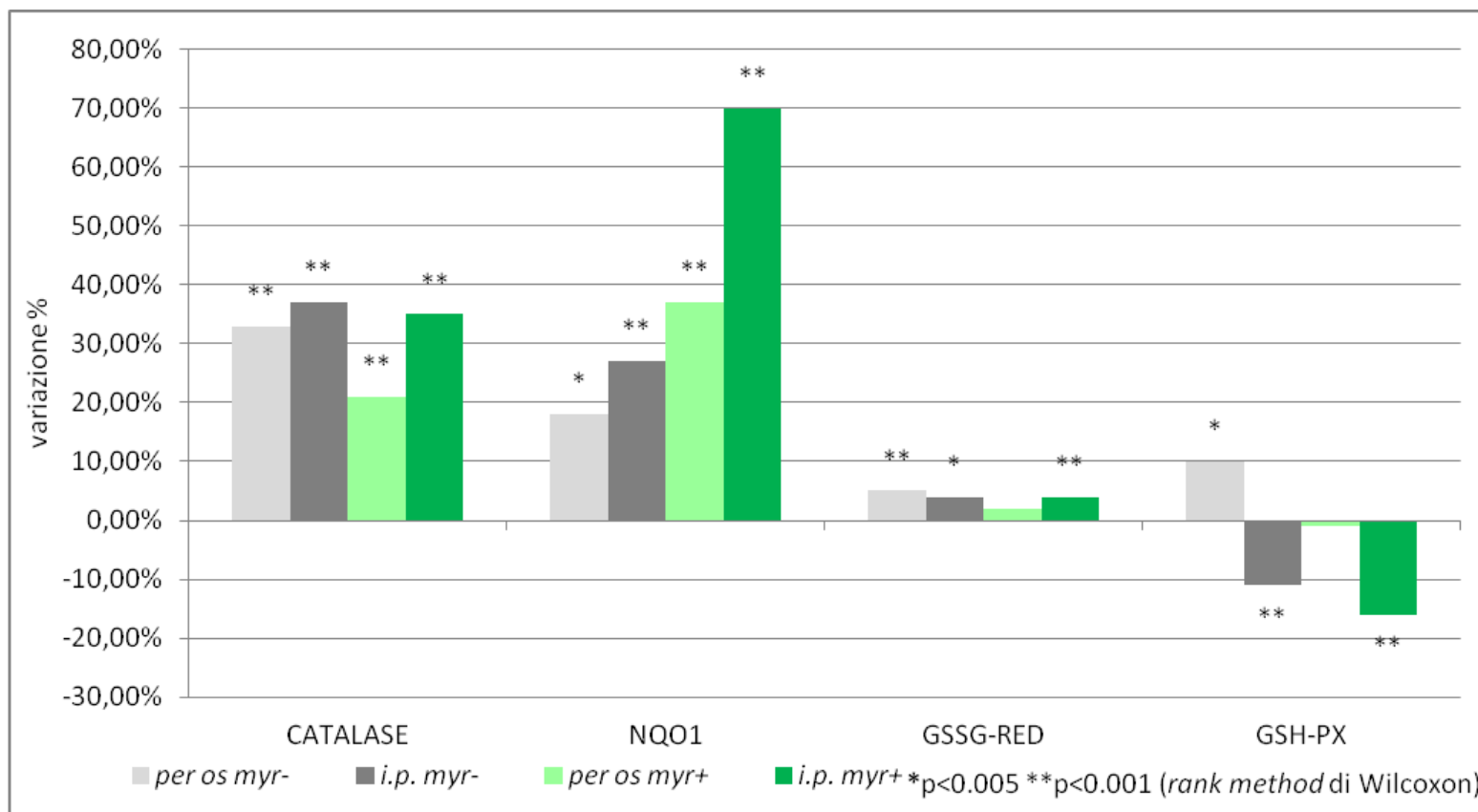


TABELLA 10.5. CONTENUTO DI GLUCOSINOLATI NELL'ESTRATTO DI GERMOGLI DI CAVOLO NERO TOSCANO (TBCSE)

| glucosinolati | $\mu\text{mol g}^{-1}$ | mg g^{-1} | % p/p |
|--|--|--------------------------------------|--------------|
| glucorafanina (GRA) | 169.8 \pm 2.9 | 80.7 \pm 1.4 | 8.1 |
| 4-OH-glucobrassicina (4OH-GBS) | 12.9 \pm 2.3 | 6.5 \pm 1.1 | 0.7 |
| glucoerucina (GER) | 88.2 \pm 2.2 | 40.6 \pm 1.0 | 4.1 |
| glucobrassicina (GBS) | 2.6 \pm 0.2 | 1.3 \pm 0.1 | 0.1 |
| 4-Methoxy-glucobrassicina (4OM-GBS) | 7.1 \pm 0.9 | 3.7 \pm 0.5 | 0.4 |
| neo-glucobrassicina (NEOGBS) | 6.7 \pm 1.1 | 3.4 \pm 0.6 | 0.3 |
| totale | 287.3 \pm 9.6 | 136.2 \pm 4.7 | 13.7 |

Ogni valore rappresenta la media \pm deviazione *standard* di tre determinazioni indipendenti tramite analisi HPLC.

TABELLA 10.6. VARIAZIONI DEL PESO CORPOREO E DEL FEGATO, E DELL'ASSUNZIONE DI CIBO IN RATTI ALIMENTATI CON DIETA STANDARD (RD), DIETA IPERLIPIDICA (HFD) O CON HFD + ESTRATTO DI GERMOGLI DI CAVOLO NERO TOSCANO (TBCSE)

| parametri | RD | HFD | HFD + TBCSE MYR- (15 mg/Kg p.c.) | HFD + TBCSE MYR- (150 mg/Kg p.c.) | HFD + TBCSE MYR+ (15 mg/Kg p.c.) | HFD + TBCSE MYR+ (150 mg/Kg p.c.) |
|-----------------------------------|----------------|----------------------------|--|---|--|---|
| peso corporeo (g): | | | | | | |
| iniziale | 175.75 ± 7.27 | 174.01 ± 4.32 | 176.33 ± 6.35 | 175.67 ± 4.93 | 175.33 ± 4.51 | 175.67 ± 4.04 |
| finale | 307.01 ± 10.39 | 335.01 ± 6.27 ^a | 327.67 ± 9.50 | 304.01 ± 39.95 | 299.33 ± 9.82** | 317.01 ± 26.67 |
| aumento di peso corporeo | 131.25 ± 8.88 | 161.01 ± 3.37 ^a | 151.33 ± 4.93** | 128.33 ± 35.10 | 124.01 ± 6.56** | 141.33 ± 23.46 |
| peso del fegato (g) | 7.53 ± 0.40 | 10.93 ± 0.22 ^a | 10.71 ± 0.25 | 9.24 ± 1.44 | 8.78 ± 0.48** | 10.17 ± 0.99 |
| assunzione di cibo (g/die) | 20.01 ± 2.01 | 17.04 ± 1.89 ^b | 16.01 ± 1.01 | 14.80 ± 1.14* | 14.90 ± 0.94* | 16.03 ± 0.63 |

Ogni valore rappresenta la media ± deviazione *standard* di sei esperimenti indipendenti eseguiti su sei differenti animali.

*=p<0.05 e **=p<0.01 rispetto al gruppo HFD; ^b= P<0.05 e ^a= P<0.01 rispetto al gruppo RD, secondo il *rank method* di Wilcoxon.

TABELLA 10.7. ALTERAZIONI DEL PROFILO LIPIDICO SIERICO IN RATTI ALIMENTATI CON DIETA STANDARD (RD), DIETA IPERLIPIDICA (HFD) O CON HFD + ESTRATTO DI GERMOGLI DI CAVOLO NERO TOSCANO (TBCSE)

| parametri | RD | HFD | HFD + TBCSE MYR- (15 mg/Kg p.c.) | HFD + TBCSE MYR- (150 mg/Kg p.c.) | HFD + TBCSE MYR+ (15 mg/Kg p.c.) | HFD + TBCSE MYR+ (150 mg/Kg p.c.) |
|---------------------------------------|-----------------|------------------------------|--|---|--|---|
| colesterolo totale (mg/dL) | 96.001 ± 4.243 | 148.001 ± 5.292 ^a | 122.001 ± 14.107** | 137.001 ± 35.539 | 138.333 ± 34.990 | 143.667 ± 22.030 |
| trigliceridi (mg/dL) | 67.250 ± 10.813 | 89.333 ± 22.591 ^b | 76.001 ± 16.093 | 67.667 ± 10.214* | 74.333 ± 8.505 | 87.333 ± 24.090 |
| NEFA (mmol/L) | 1.003 ± 0.103 | 1.413 ± 0.225 ^a | 1.067 ± 0.287** | 1.070 ± 0.096** | 1.147 ± 0.046* | 1.423 ± 0.405 |

Ogni valore rappresenta la media ± deviazione *standard* di sei esperimenti indipendenti eseguiti su sei differenti animali.

*=p<0.05 e **=p<0.01 rispetto al gruppo HFD; ^b= P<0.05 e ^a= P<0.01 rispetto al gruppo RD, secondo il *rank method* di Wilcoxon.

TABELLA 10.8. MODULAZIONE DEGLI ENZIMI ANTIOSSIDANTI NEL CITOSOL DI FEGATO DI RATTI ALIMENTATI CON DIETA STANDARD (RD), DIETA IPERLIPIDICA (HFD) O CON HFD + ESTRATTO DI GERMOGLI DI CAVOLO NERO TOSCANO (TBCSE)

| parametri | RD | HFD | HFD + TBCSE MYR- (15 mg/Kg p.c.) | HFD + TBCSE MYR- (150 mg/Kg p.c.) | HFD + TBCSE MYR+ (15 mg/Kg p.c.) | HFD + TBCSE MYR+ (150 mg/Kg p.c.) |
|---|--------------------|---------------------------------|--|---|--|---|
| catalasi ($\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$) | 39.280 \pm 1.153 | 35.250 \pm 1.063 ^a | 36.725 \pm 1.201* | 35.543 \pm 0.413 | 43.138 \pm 1.415** | 35.508 \pm 1.386 |
| NAD(P)H:chinone reduttasi ($\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$) | 20.841 \pm 0.899 | 17.051 \pm 0.355 ^a | 18.526 \pm 0.926** | 41.215 \pm 0.905** | 18.828 \pm 1.982 | 22.769 \pm 1.670** |
| GSH-perossidasi ($\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$) | 65.335 \pm 1.299 | 63.899 \pm 3.593 | 59.743 \pm 0.344* | 60.613 \pm 5.167 | 72.951 \pm 0.143** | 70.204 \pm 0.990** |
| GSSG-reduttasi ($\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$) | 76.536 \pm 4.284 | 67.747 \pm 1.780 ^a | 68.729 \pm 1.700 | 75.997 \pm 0.355** | 72.845 \pm 0.394** | 69.303 \pm 1.320 |
| superossido dismutasi ($\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$) | 67.375 \pm 3.061 | 56.753 \pm 4.930 ^a | 65.852 \pm 3.021** | 83.404 \pm 1.851** | 58.554 \pm 3.780 | 46.571 \pm 6.227* |

Ogni valore rappresenta la media \pm deviazione *standard* di sei esperimenti indipendenti eseguiti su sei differenti animali.

*=p<0.05 e **=p<0.01 rispetto al gruppo HFD; ^a= P<0.01 rispetto al gruppo RD, secondo il *rank method* di Wilcoxon.

TABELLA 10.9. MODULAZIONE DEGLI ENZIMI DI FASE II IN MICROSOMI DI FEGATO DI RATTI ALIMENTATI CON DIETA STANDARD (RD), DIETA IPERLIPIDICA (HFD) O CON HFD + ESTRATTO DI GERMOGLI DI CAVOLO NERO TOSCANO (TBCSE)

| parametri | RD | HFD | HFD + TBCSE MYR- (15 mg/Kg p.c.) | HFD + TBCSE MYR- (150 mg/Kg p.c.) | HFD + TBCSE MYR+ (15 mg/Kg p.c.) | HFD + TBCSE MYR+ (150 mg/Kg p.c.) |
|--|----------------|----------------------------|--|---|--|---|
| glutazione S-transferasi (nmol mg ⁻¹ min ⁻¹) | 10.243 ± 0.229 | 7.334 ± 0.228 ^a | 7.392 ± 0.230 | 8.206 ± 0.277** | 7.827 ± 0.341* | 7.523 ± 0.275 |
| UDP-glucuronosil transferasi (nmol mg ⁻¹ min ⁻¹) | 1.455 ± 0.143 | 0.854 ± 0.106 ^a | 1.003 ± 0.046* | 1.334 ± 0.117** | 1.303 ± 0.166** | 1.474 ± 0.214** |

Ogni valore rappresenta la media ± deviazione *standard* di sei esperimenti indipendenti eseguiti su sei differenti animali.

*=p<0.05 e **=p<0.01 rispetto al gruppo HFD; ^a= P<0.01 rispetto al gruppo RD, secondo il *rank method* di Wilcoxon.

GRAFICO 10.4. AUMENTO DEL PESO CORPOREO NEL TEMPO IN RATTI ALIMENTATI CON DIETA STANDARD (RD), DIETA IPERLIPIDICA (HFD) O CON HFD + ESTRATTO DI GERMOGLI DI CAVOLO NERO TOSCANO (TBCSE)

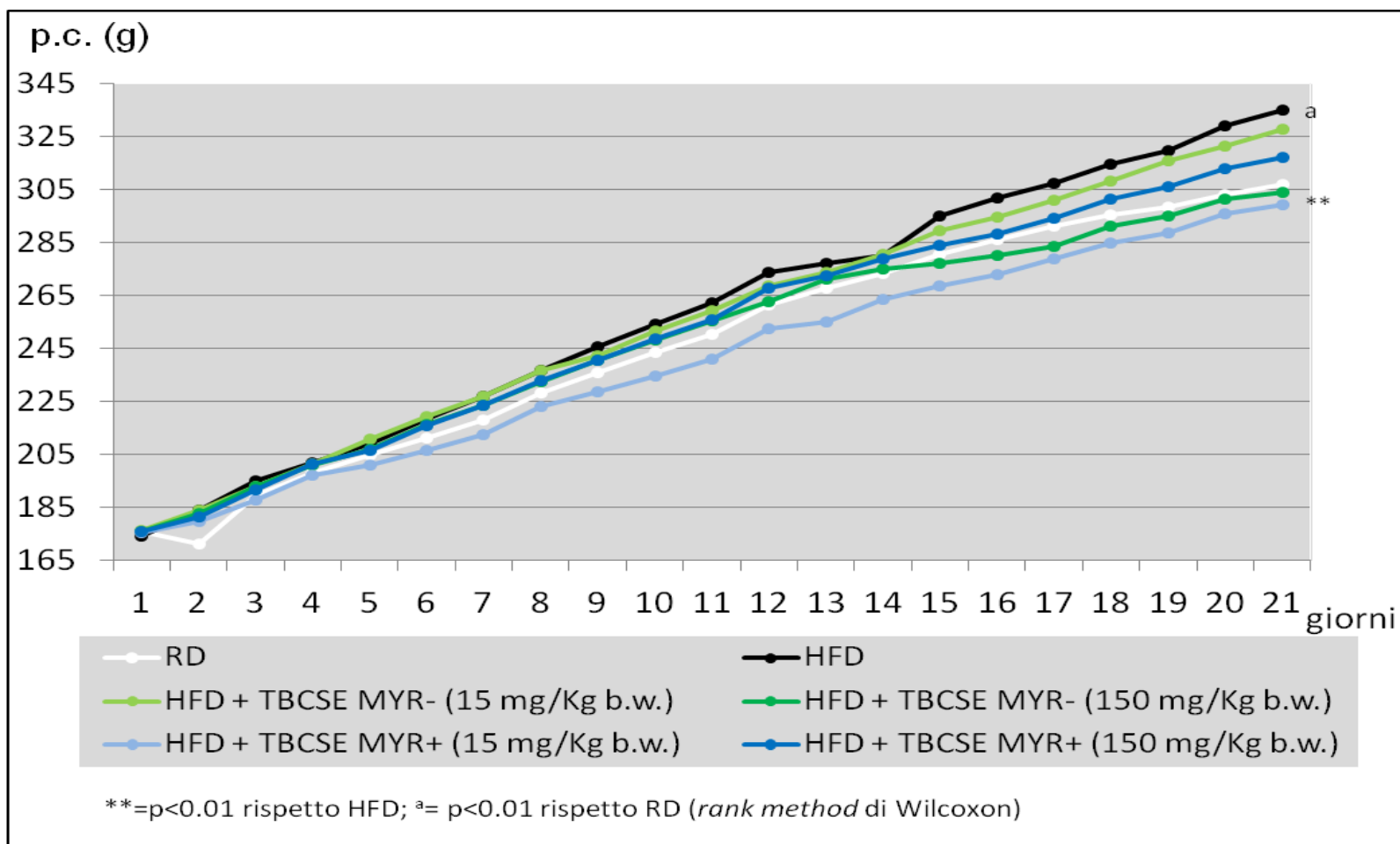


GRAFICO 10.5. VARIAZIONE DEL COLESTEROLO TOTALE NEL SIERO DI RATTI ALIMENTATI CON DIETA STANDARD (RD), DIETA IPERLIPIDICA (HFD) O CON HFD + ESTRATTO DI GERMOGLI DI CAVOLO NERO TOSCANO (TBCSE)

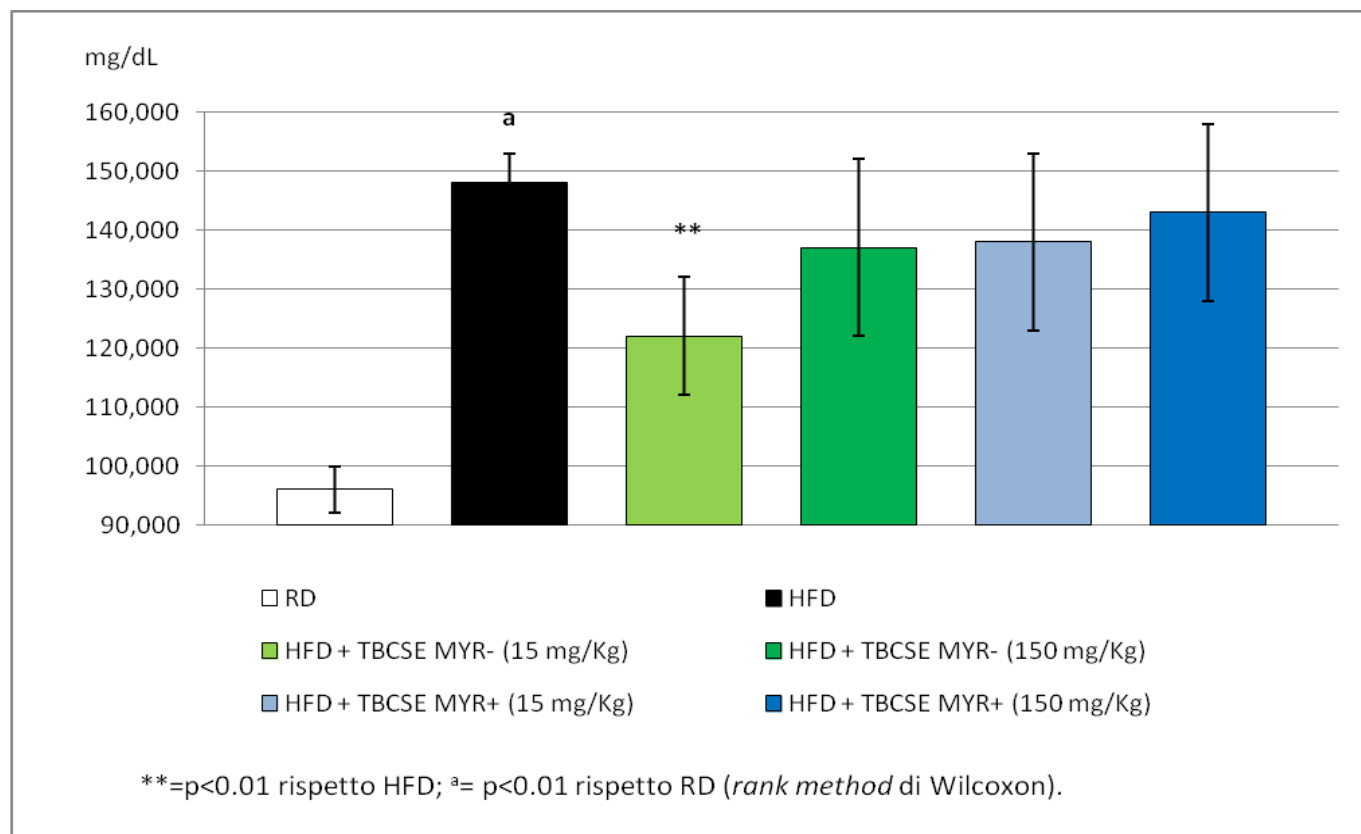


GRAFICO 10.7. VARIAZIONE DEGLI ACIDI GRASSI NON ESTERIFICATI NEL SIERO DI RATTI ALIMENTATI CON DIETA STANDARD (RD), DIETA IPERLIPIDICA (HFD) O CON HFD + ESTRATTO DI GERMOGLI DI CAVOLO NERO TOSCANO (TBCSE)

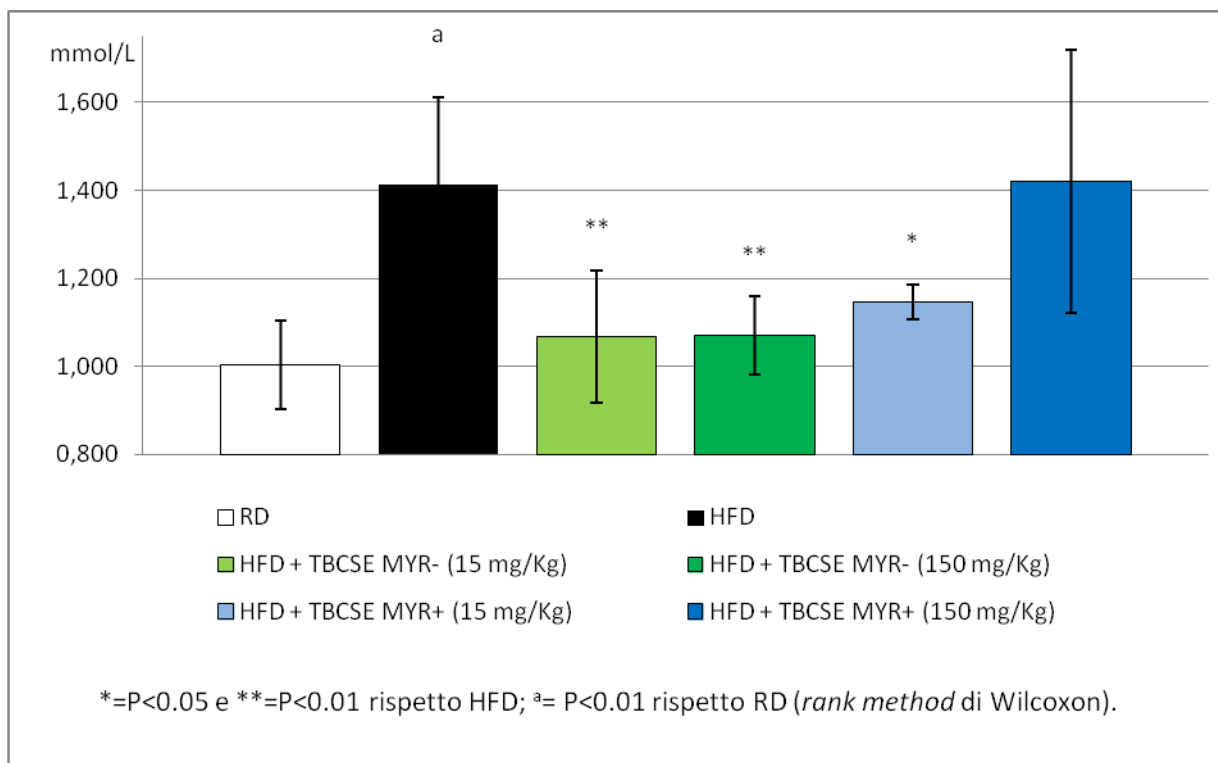
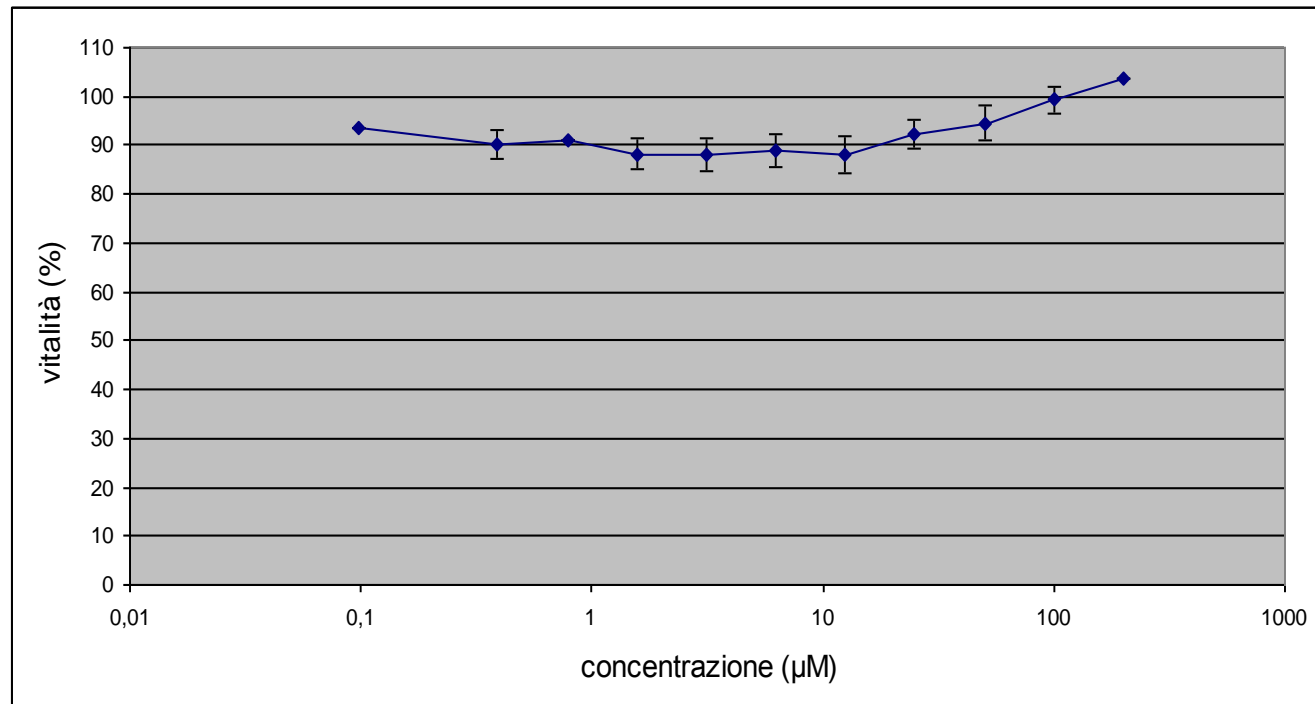
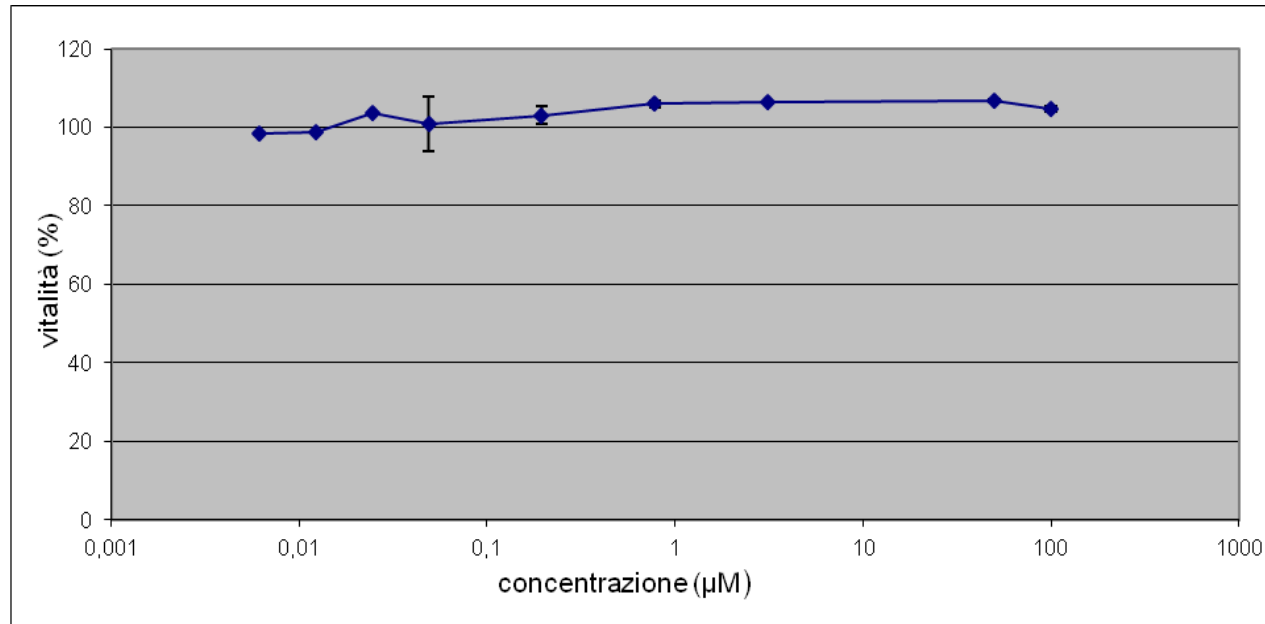


GRAFICO 10.10. EFFETTO DELLA GLUCORAFANINA SULLA VITALITÀ CELLULARE



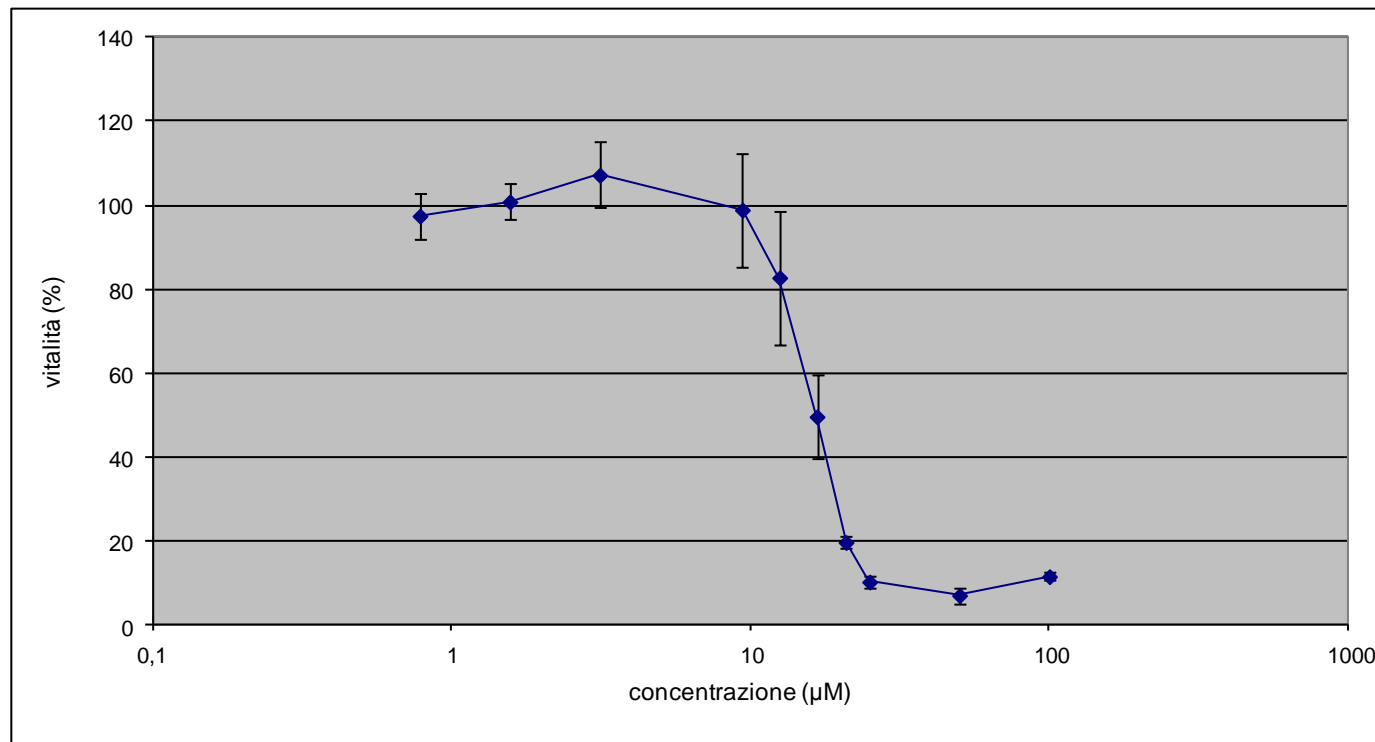
Il grafico mostra la vitalità cellulare in seguito all'esposizione con concentrazioni crescenti di glucorafanina per 72 ore, rispetto a cellule di controllo.

GRAFICO 10.11. EFFETTI DEL BENZO(a)PIRENE SULLA VITALITÀ CELLULARE



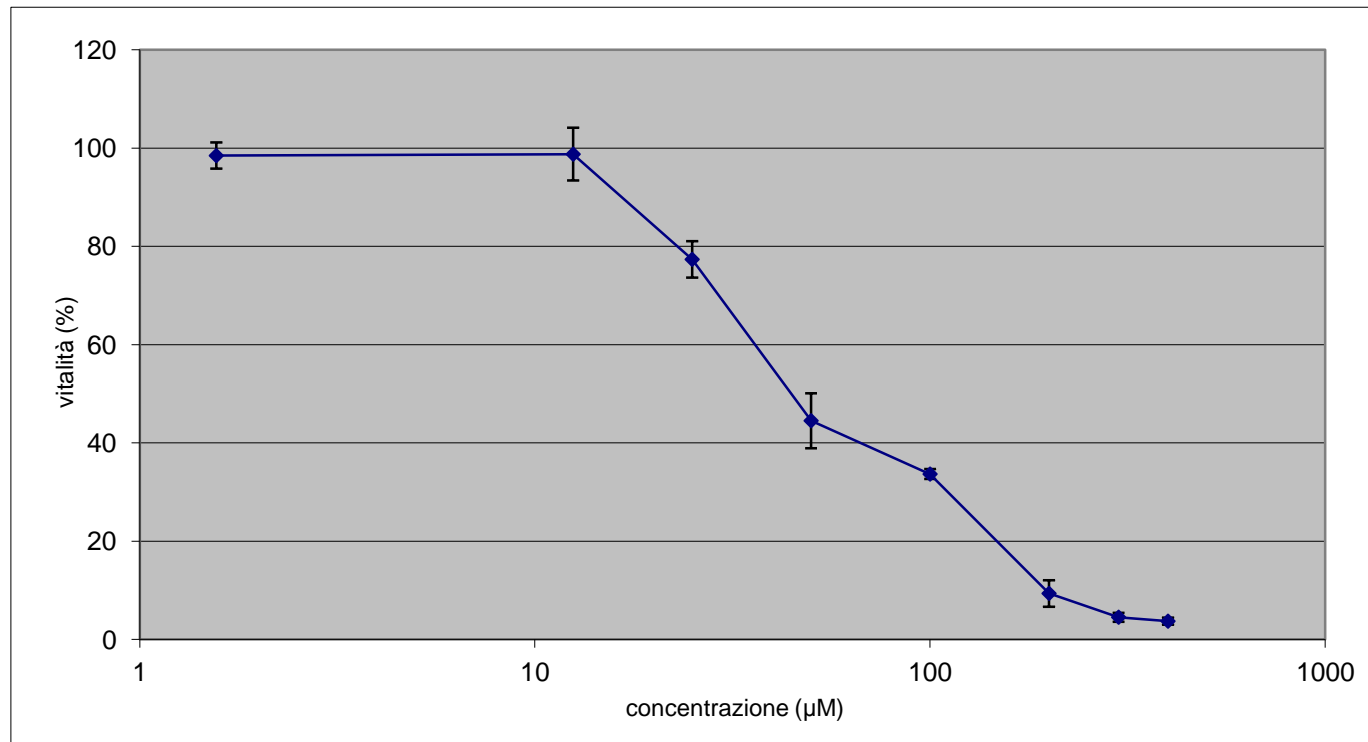
Il grafico mostra la vitalità cellulare in seguito all'esposizione con concentrazioni crescenti di benzo(a)pirene per 72 ore, rispetto a cellule di controllo.

GRAFICO 10.12. EFFETTI DEL SULFORAFANE SULLA VITALITÀ CELLULARE



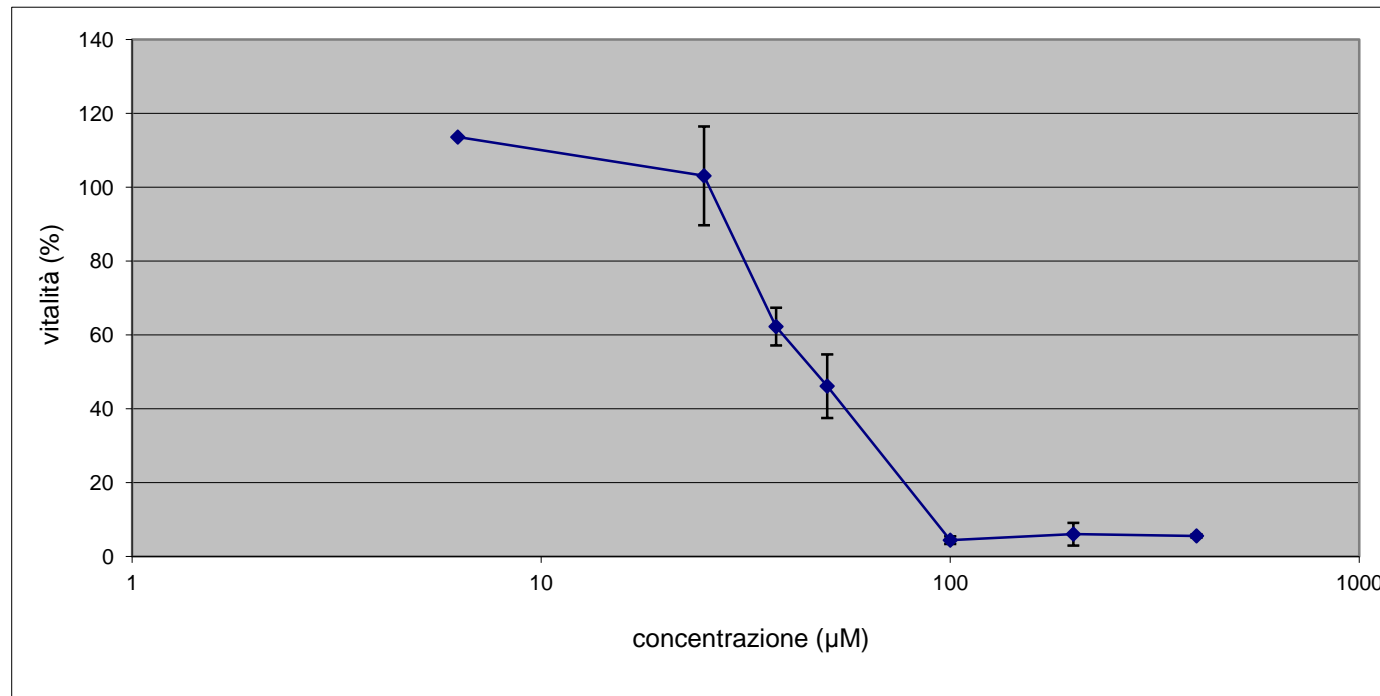
Il grafico mostra la vitalità cellulare in seguito all'esposizione con concentrazioni crescenti di Sulforafane per 72 ore, rispetto a cellule di controllo.

GRAFICO 10.13. EFFETTI DELL'INDOLO-3-CARBINOLO SULLA VITALITÀ CELLULARE



Il grafico mostra la vitalità cellulare in seguito all'esposizione con concentrazioni crescenti di Indolo-3-carbinolo per 72 ore, rispetto a cellule di controllo.

GRAFICO 10.14. EFFETTI DEL 3,3'-DIINDOLIMETANO SULLA VITALITÀ CELLULARE



Il grafico mostra la vitalità cellulare in seguito all'esposizione con concentrazioni crescenti di 3,3'-diindolimetano per 72 ore, rispetto a cellule di controllo.

TABELLA 10.10. CONCENTRAZIONE EFFETTIVA CHE PROVOCA LA RIDUZIONE DI VITALITA' CELLULARE DEL 20 %

| | Sulforafane | Indolo-3-carbinolo | 3,3'-Diindolimetano |
|------------------|--------------------|---------------------------|----------------------------|
| EC20 (µM) | 12.66 ± 1.20 | 19.99 ± 0.66 | 37.10 ± 3.48 |

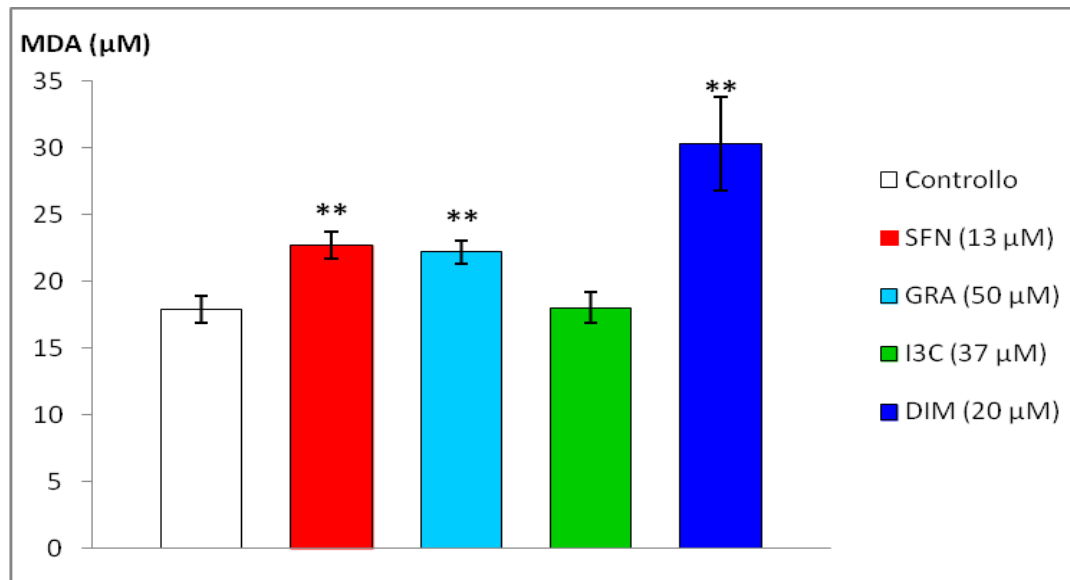
La tabella mostra i valori di EC20 calcolati tramite analisi di regressione dei dati ottenuti da tre esperimenti indipendenti e utilizzando epatociti isolati da tre animali diversi.

TABELLA 10.11. CONCENTRAZIONE DI MALONDIALDEIDE IN EPATOCITI ESPOSTI A MOLECOLE DERIVATE DA BRASSICACEAE

| campione | MDA (μM) |
|--|---------------------------------------|
| controllo | 17.89 \pm 1.04 |
| SFN (13 μM) | 22.70 \pm 1.13** |
| GRA (50 μM) | 22.18 \pm 0.98** |
| I3C (37 μM) | 18.01 \pm 1.15 |
| DIM (20 μM) | 30.8 \pm 3.51** |
| BaP (50 μM) | 16.2 \pm 6.57 |

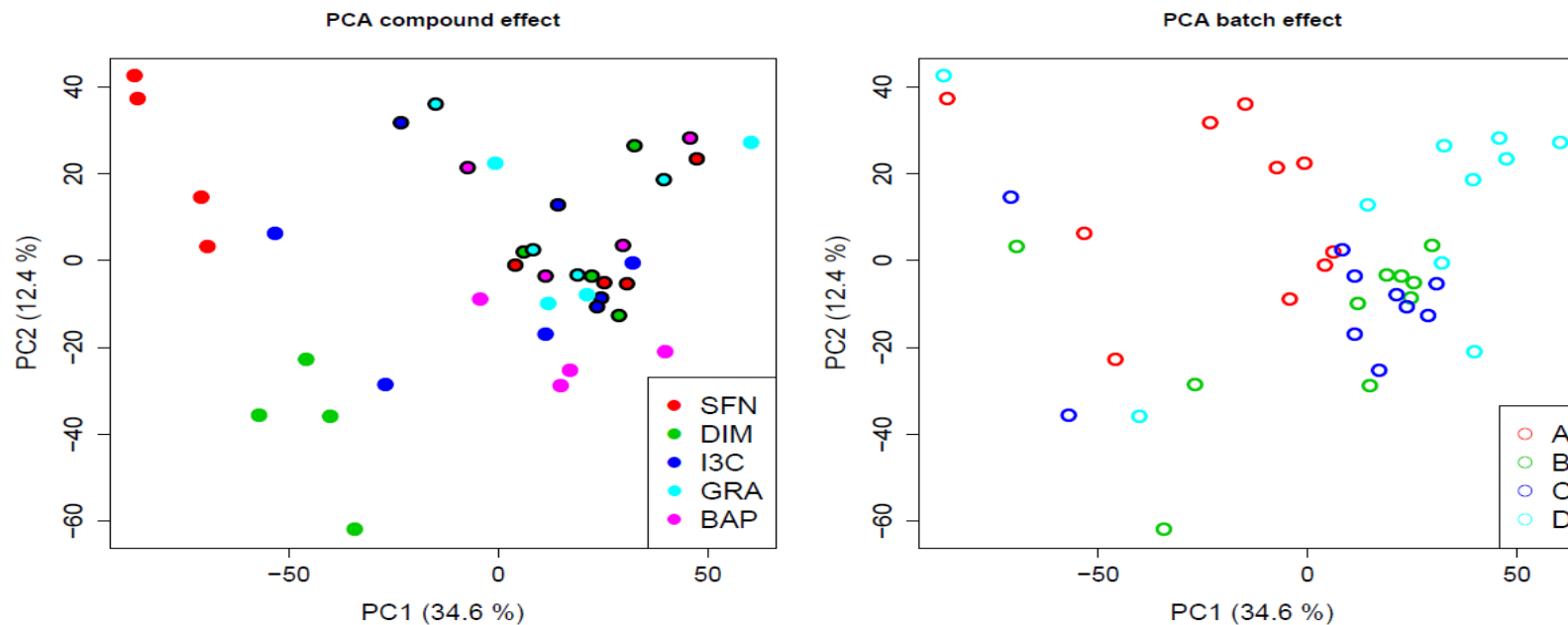
Ogni valore rappresenta la media \pm deviazione *standard* di tre esperimenti indipendenti eseguiti su epatociti primari. **= $P < 0.01$ rispetto al controllo (t-test).

GRAFICO 10.15. CONCENTRAZIONE DI MALONDIALDEIDE IN EPATOCITI ESPOSTI A MOLECOLE DERIVATE DA BRASSICACEAE



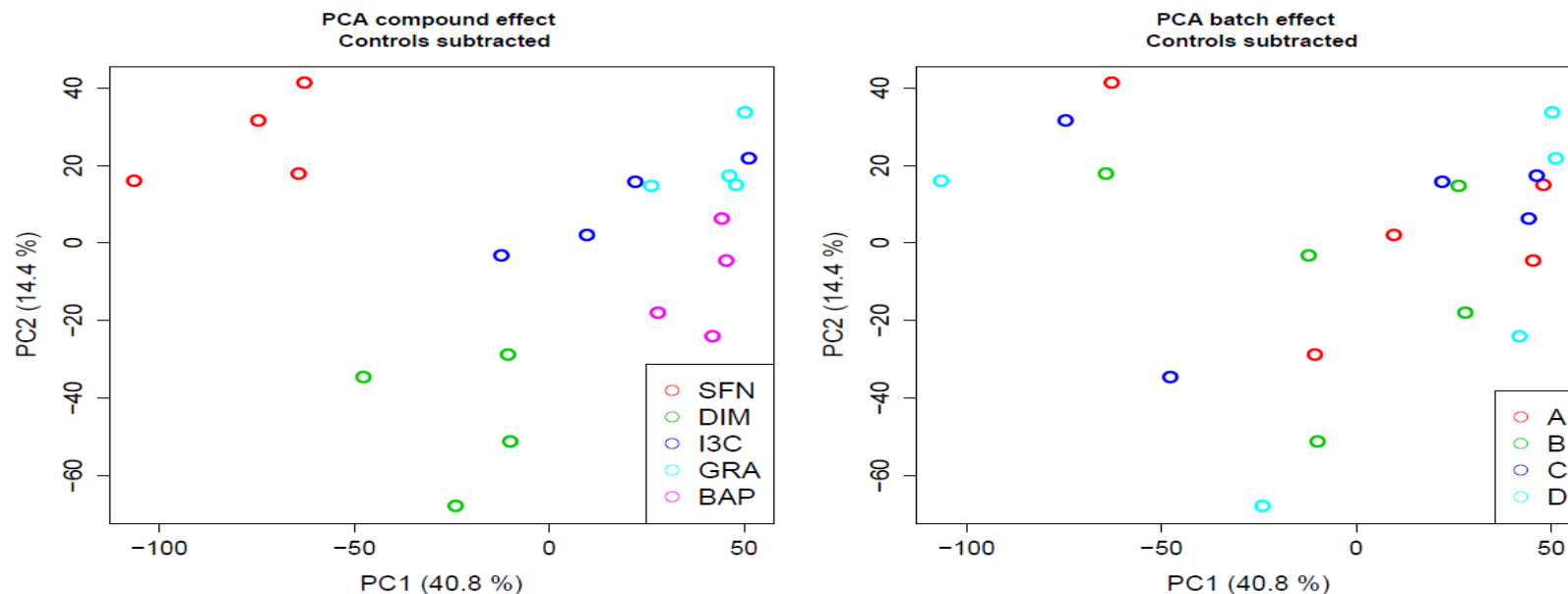
Ogni valore rappresenta la media \pm deviazione *standard* di tre esperimenti indipendenti eseguiti su epatociti primari. **= $p < 0.01$ rispetto al controllo

GRAFICO 10.16. ANALISI DELLE COMPONENTI PRINCIPALI DELL'ESPRESSIONE GENICA



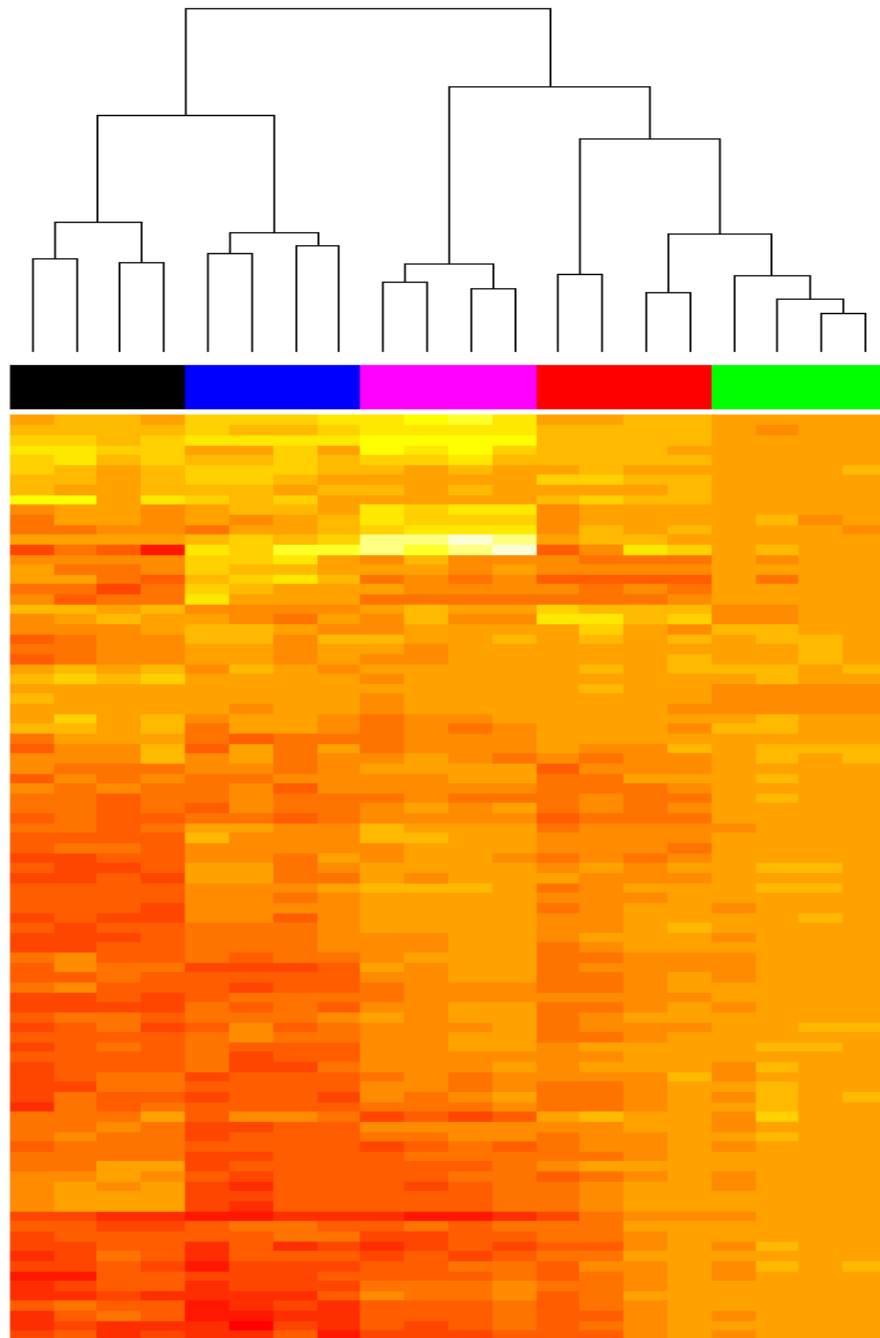
Il grafico mostra gli effetti dovuti all'esposizione dei diversi composti (sinistra), e il *batch effect* (destra). Ogni punto nel grafico rappresenta il profilo di espressione genica totale, ottenuto in seguito all'esposizione a diverse molecole (SFN: sulforafane; DIM: 3,3'-diindolimetano; I3C: indolo-3-carbinolo; GRA: glucorafanina; BaP: benzo(a)pirene). I punti cerchiati in nero rappresentano i rispettivi controlli esposti solamente al solvente. Ogni lettera (A, B, C, o D), rappresenta campioni, ottenuti dallo stesso animale e nello stesso giorno, esposti a diverse molecole. I valori degli assi esprimono la percentuale della varianza totale dei dati, che le componenti principali (assi x e y) rappresentano.

GRAFICO 10.17. ANALISI DELLE COMPONENTI PRINCIPALI DELL'ESPRESSIONE GENICA NORMALIZZATA AI CONTROLLI



Il grafico mostra gli effetti dovuti all'esposizione dei diversi composti (sinistra), e il *batch effect* (destra), dopo aver sottratto i valori dei corrispondenti controlli. Ogni punto nel grafico rappresenta il profilo di espressione genica totale, ottenuto in seguito all'esposizione dei diversi composti (SFN: sulforafane; DIM: 3,3'-diindolimetano; I3C: indolo-3-carbinolo; GRA: glucorafanina; BaP: benzo(a)pirene). I punti cerchiati in nero rappresentano i rispettivi controlli esposti solamente al solvente. Ogni lettera (A, B, C, o D), rappresenta campioni, ottenuti dallo stesso animale e nello stesso giorno, esposti a diverse molecole. I valori degli assi esprimono la percentuale della varianza totale dei dati, che le componenti principali (assi x e y) rappresentano.

FIGURA 10.3. HEATMAP



L'*heatmap* è basata su i 100 geni più significativi (righe) modulati dalle molecole (colonne), secondo il Limma t test. I colori indicano il livello di espressione genica rispetto ai controlli: la scala di colori rossi indica un aumento, e la scala di colori gialli una riduzione, dell'espressione genica. Nero: SFN, blu: DIM, viola: BaP, rosso: I3C, verde: GRA. Le similitudini dei *patterns* di espressione genica sono indicati dal dendrogramma basato sulla correlazione di Pearson.

**TABELLA 10.12. ANALISI ONTOLOGICA DEI GENI
SIGNIFICATIVAMENTE MODULATI DAL SULFORAFANE**

| GO.ID | Term | Annotated | Significant | Expected | Rank in KS | elim | |
|-------|------------|---|-------------|----------|------------|-------|---------|
| 1 | GO:0032981 | mitochondrial respiratory chain complex ... | 15 | 14 | 7.69 | 3 | 0.00067 |
| 2 | GO:0008033 | tRNA processing | 65 | 46 | 33.31 | 6 | 0.00105 |
| 3 | GO:0009063 | cellular amino acid catabolic process | 98 | 69 | 50.21 | 4 | 0.00122 |
| 4 | GO:0046686 | response to cadmium ion | 65 | 45 | 33.31 | 70 | 0.00243 |
| 5 | GO:0044272 | sulfur compound biosynthetic process | 77 | 52 | 39.45 | 16 | 0.00272 |
| 6 | GO:0006635 | fatty acid beta-oxidation | 72 | 49 | 36.89 | 5 | 0.00279 |
| 7 | GO:0045745 | positive regulation of G-protein coupled... | 16 | 14 | 8.20 | 71 | 0.00281 |
| 8 | GO:0043277 | apoptotic cell clearance | 30 | 23 | 15.37 | 109 | 0.00389 |
| 9 | GO:0006518 | peptide metabolic process | 85 | 56 | 43.55 | 24 | 0.00439 |
| 10 | GO:0006563 | L-serine metabolic process | 8 | 8 | 4.10 | 82 | 0.00474 |
| 11 | GO:0006534 | cysteine metabolic process | 8 | 8 | 4.10 | 19 | 0.00474 |
| 12 | GO:0071377 | cellular response to glucagon stimulus | 8 | 8 | 4.10 | 12 | 0.00474 |
| 13 | GO:0051103 | DNA ligation involved in DNA repair | 8 | 8 | 4.10 | 155 | 0.00474 |
| 14 | GO:0002407 | dendritic cell chemotaxis | 8 | 8 | 4.10 | 39 | 0.00474 |
| 15 | GO:0051186 | cofactor metabolic process | 285 | 172 | 146.03 | 573 | 0.00477 |
| 16 | GO:0006622 | protein targeting to lysosome | 15 | 13 | 7.69 | 43 | 0.00485 |
| 17 | GO:0071397 | cellular response to cholesterol | 15 | 13 | 7.69 | 18 | 0.00485 |
| 18 | GO:0006284 | base-excision repair | 32 | 24 | 16.40 | 54 | 0.00522 |
| 19 | GO:0008652 | cellular amino acid biosynthetic process | 117 | 74 | 59.95 | 11 | 0.00570 |
| 20 | GO:0000038 | very long-chain fatty acid metabolic pro... | 26 | 20 | 13.32 | 209 | 0.00664 |
| 21 | GO:0034694 | response to prostaglandin stimulus | 26 | 20 | 13.32 | 69 | 0.00664 |
| 22 | GO:0035335 | peptidyl-tyrosine dephosphorylation | 64 | 43 | 32.79 | 77 | 0.00706 |
| 23 | GO:0009074 | aromatic amino acid family catabolic pro... | 11 | 10 | 5.64 | 60 | 0.00731 |
| 24 | GO:0045426 | quinone cofactor biosynthetic process | 11 | 10 | 5.64 | 201 | 0.00731 |
| 25 | GO:0006636 | unsaturated fatty acid biosynthetic proc... | 44 | 31 | 22.55 | 23 | 0.00751 |
| 26 | GO:0046676 | negative regulation of insulin secretion | 49 | 34 | 25.11 | 140 | 0.00757 |
| 27 | GO:0042402 | cellular biogenic amine catabolic proces... | 20 | 16 | 10.25 | 40 | 0.00798 |
| 28 | GO:0006020 | inositol metabolic process | 14 | 12 | 7.17 | 236 | 0.00829 |
| 29 | GO:0035418 | protein localization to synapse | 28 | 21 | 14.35 | 281 | 0.00892 |
| 30 | GO:0006568 | tryptophan metabolic process | 7 | 7 | 3.59 | 37 | 0.00926 |
| 31 | GO:0090267 | positive regulation of mitotic cell cycl... | 7 | 7 | 3.59 | 195 | 0.00926 |
| 32 | GO:0034123 | positive regulation of toll-like recepto... | 7 | 7 | 3.59 | 150 | 0.00926 |
| 33 | GO:0060591 | chondroblast differentiation | 7 | 7 | 3.59 | 243 | 0.00926 |
| 34 | GO:0051096 | positive regulation of helicase activity | 7 | 7 | 3.59 | 15 | 0.00926 |
| 35 | GO:0009191 | ribonucleoside diphosphate catabolic pro... | 7 | 7 | 3.59 | 96 | 0.00926 |
| 36 | GO:0051409 | response to nitrosative stress | 7 | 7 | 3.59 | 2 | 0.00926 |
| 37 | GO:0002001 | renin secretion into blood stream | 7 | 7 | 3.59 | 204 | 0.00926 |
| 38 | GO:0046470 | phosphatidylcholine metabolic process | 38 | 27 | 19.47 | 385 | 0.01038 |
| 39 | GO:0046685 | response to arsenic-containing substance | 30 | 22 | 15.37 | 1 | 0.01149 |
| 40 | GO:0046486 | glycerolipid metabolic process | 297 | 172 | 152.18 | 2402 | 0.01160 |
| 41 | GO:0042439 | ethanolamine-containing compound metabol... | 50 | 34 | 25.62 | 459 | 0.01211 |
| 42 | GO:0006744 | ubiquinone biosynthetic process | 10 | 9 | 5.12 | 332 | 0.01310 |
| 43 | GO:0010867 | positive regulation of triglyceride bios... | 16 | 13 | 8.20 | 207 | 0.01368 |
| 44 | GO:0045064 | T-helper 2 cell differentiation | 16 | 13 | 8.20 | 122 | 0.01368 |
| 45 | GO:0006743 | ubiquinone metabolic process | 13 | 11 | 6.66 | 356 | 0.01407 |
| 46 | GO:0010044 | response to aluminum ion | 13 | 11 | 6.66 | 22 | 0.01407 |
| 47 | GO:0009083 | branched-chain amino acid catabolic proc... | 13 | 11 | 6.66 | 389 | 0.01407 |
| 48 | GO:0006805 | xenobiotic metabolic process | 42 | 29 | 21.52 | 217 | 0.01468 |
| 49 | GO:0071466 | cellular response to xenobiotic stimulus | 42 | 29 | 21.52 | 218 | 0.01468 |
| 50 | GO:0045619 | regulation of lymphocyte differentiation | 108 | 67 | 55.34 | 168 | 0.01517 |
| 51 | GO:0006732 | coenzyme metabolic process | 237 | 142 | 121.44 | 80 | 0.01704 |
| 52 | GO:0034067 | protein localization to Golgi apparatus | 21 | 16 | 10.76 | 176 | 0.01760 |
| 53 | GO:0043603 | cellular amide metabolic process | 21 | 16 | 10.76 | 2167 | 0.01760 |
| 54 | GO:0045736 | negative regulation of cyclin-dependent ... | 21 | 16 | 10.76 | 248 | 0.01760 |
| 55 | GO:0051597 | response to methylmercury | 21 | 16 | 10.76 | 49 | 0.01760 |
| 56 | GO:0044111 | development involved in symbiotic intera... | 6 | 6 | 3.07 | 65 | 0.01808 |
| 57 | GO:0042271 | susceptibility to natural killer cell me... | 6 | 6 | 3.07 | 63 | 0.01808 |
| 58 | GO:0019064 | viral entry into host cell via membrane ... | 6 | 6 | 3.07 | 110 | 0.01808 |
| 59 | GO:0019089 | transmission of virus | 6 | 6 | 3.07 | 66 | 0.01808 |
| 60 | GO:0035754 | B cell chemotaxis | 6 | 6 | 3.07 | 366 | 0.01808 |
| 61 | GO:0010768 | negative regulation of transcription fro... | 6 | 6 | 3.07 | 67 | 0.01808 |
| 62 | GO:0032202 | telomere assembly | 6 | 6 | 3.07 | 123 | 0.01808 |
| 63 | GO:0034696 | response to prostaglandin F stimulus | 6 | 6 | 3.07 | 327 | 0.01808 |
| 64 | GO:0009202 | deoxyribonucleoside triphosphate biosynt... | 6 | 6 | 3.07 | 32 | 0.01808 |
| 65 | GO:0044007 | dissemination or transmission of symbion... | 6 | 6 | 3.07 | 11134 | 0.01808 |
| 66 | GO:0051821 | dissemination or transmission of organis... | 6 | 6 | 3.07 | 11135 | 0.01808 |

| | GO.ID | Term | Annotated | Significant | Expected | Rank in KS | elim |
|-----|------------|---|-----------|-------------|----------|------------|---------|
| 67 | GO:0008202 | steroid metabolic process | 300 | 172 | 153.72 | 295 | 0.01883 |
| 68 | GO:0009064 | glutamine family amino acid metabolic pr... | 77 | 49 | 39.45 | 1069 | 0.01884 |
| 69 | GO:0006066 | alcohol metabolic process | 318 | 186 | 162.94 | 148 | 0.01918 |
| 70 | GO:0000097 | sulfur amino acid biosynthetic process | 18 | 14 | 9.22 | 307 | 0.01991 |
| 71 | GO:0002455 | humoral immune response mediated by circ... | 41 | 28 | 21.01 | 2299 | 0.02025 |
| 72 | GO:0018149 | peptide cross-linking | 31 | 22 | 15.88 | 97 | 0.02056 |
| 73 | GO:0017144 | drug metabolic process | 36 | 25 | 18.45 | 178 | 0.02065 |
| 74 | GO:0042180 | cellular ketone metabolic process | 925 | 548 | 473.97 | 247 | 0.02102 |
| 75 | GO:0006644 | phospholipid metabolic process | 277 | 159 | 141.93 | 727 | 0.02202 |
| 76 | GO:0009070 | serine family amino acid biosynthetic pr... | 15 | 12 | 7.69 | 199 | 0.02209 |
| 77 | GO:0034695 | response to prostaglandin E stimulus | 15 | 12 | 7.69 | 200 | 0.02209 |
| 78 | GO:0051181 | cofactor transport | 15 | 12 | 7.69 | 169 | 0.02209 |
| 79 | GO:0032006 | regulation of TOR signaling cascade | 43 | 29 | 22.03 | 286 | 0.02323 |
| 80 | GO:0007217 | tachykinin receptor signaling pathway | 9 | 8 | 4.61 | 227 | 0.02326 |
| 81 | GO:0060596 | mammary placode formation | 9 | 8 | 4.61 | 196 | 0.02326 |
| 82 | GO:2000515 | negative regulation of CD4-positive, alp... | 9 | 8 | 4.61 | 113 | 0.02326 |
| 83 | GO:2000648 | positive regulation of stem cell prolif... | 9 | 8 | 4.61 | 335 | 0.02326 |
| 84 | GO:0006650 | glycerophospholipid metabolic process | 202 | 118 | 103.50 | 674 | 0.02341 |
| 85 | GO:0071941 | nitrogen cycle metabolic process | 12 | 10 | 6.15 | 2831 | 0.02360 |
| 86 | GO:0006591 | omithine metabolic process | 12 | 10 | 6.15 | 105 | 0.02360 |
| 87 | GO:0006654 | phosphatidic acid biosynthetic process | 12 | 10 | 6.15 | 542 | 0.02360 |
| 88 | GO:0019627 | urea metabolic process | 12 | 10 | 6.15 | 2832 | 0.02360 |
| 89 | GO:0071621 | granulocyte chemotaxis | 12 | 10 | 6.15 | 85 | 0.02360 |
| 90 | GO:0042092 | type 2 immune response | 28 | 20 | 14.35 | 1985 | 0.02432 |
| 91 | GO:0001954 | positive regulation of cell-matrix adhes... | 33 | 23 | 16.91 | 61 | 0.02455 |
| 92 | GO:0009410 | response to xenobiotic stimulus | 50 | 33 | 25.62 | 88 | 0.02485 |
| 93 | GO:0006958 | complement activation, classical pathway | 20 | 15 | 10.25 | 13 | 0.02676 |
| 94 | GO:0046456 | icosanoid biosynthetic process | 40 | 27 | 20.50 | 131 | 0.02768 |
| 95 | GO:0006956 | complement activation | 40 | 27 | 20.50 | 4307 | 0.02768 |
| 96 | GO:0045577 | regulation of B cell differentiation | 25 | 18 | 12.81 | 494 | 0.02877 |
| 97 | GO:0035329 | hippo signaling cascade | 30 | 21 | 15.37 | 291 | 0.02921 |
| 98 | GO:0006575 | cellular modified amino acid metabolic p... | 165 | 97 | 84.55 | 574 | 0.03030 |
| 99 | GO:0006997 | nucleus organization | 61 | 39 | 31.26 | 992 | 0.03086 |
| 100 | GO:0009404 | toxin metabolic process | 17 | 13 | 8.71 | 4993 | 0.03091 |

La tabella mostra per ogni categoria ontologica genica (GO.ID) il numero di geni in essa contenuti (*Annotated*), il numero di geni significativamente modulati (*Significant*), il numero di geni attesi considerando il numero totale di geni modulati (*Expected*), e i valori di probabilità (*elim* e KS). Le categorie ontologiche sono disposte in tabella partendo da quella statisticamente più significativa secondo il valore di probabilità *elim*.

**TABELLA 10.13. ANALISI ONTOLOGICA DEI GENI
SIGNIFICATIVAMENTE MODULATI DAL 3,3'-DIINDOLIMETANO**

| GO.ID | Term | Annotated | Significant | Expected | Rank in KS | elim | |
|-------|------------|---|-------------|----------|------------|------|---------|
| 1 | GO:0006749 | glutathione metabolic process | 47 | 34 | 16.15 | 1 | 1.2e-07 |
| 2 | GO:0001889 | liver development | 180 | 89 | 61.85 | 6 | 2.0e-05 |
| 3 | GO:0055114 | oxidation-reduction process | 454 | 222 | 156.01 | 4 | 2.4e-05 |
| 4 | GO:0051289 | protein homotetramerization | 78 | 44 | 26.80 | 3 | 5.3e-05 |
| 5 | GO:0006596 | polyamine biosynthetic process | 9 | 9 | 3.09 | 17 | 6.7e-05 |
| 6 | GO:0006103 | 2-oxoglutarate metabolic process | 21 | 16 | 7.22 | 15 | 0.00011 |
| 7 | GO:0009063 | cellular amino acid catabolic process | 98 | 67 | 33.68 | 18 | 0.00013 |
| 8 | GO:0060416 | response to growth hormone stimulus | 39 | 25 | 13.40 | 16 | 0.00014 |
| 9 | GO:0046394 | carboxylic acid biosynthetic process | 295 | 156 | 101.37 | 873 | 0.00015 |
| 10 | GO:0006536 | glutamate metabolic process | 35 | 23 | 12.03 | 2 | 0.00015 |
| 11 | GO:0006637 | acyl-CoA metabolic process | 33 | 22 | 11.34 | 21 | 0.00015 |
| 12 | GO:0006635 | fatty acid beta-oxidation | 72 | 44 | 24.74 | 7 | 0.00015 |
| 13 | GO:0042178 | xenobiotic catabolic process | 16 | 13 | 5.50 | 12 | 0.00016 |
| 14 | GO:0009071 | serine family amino acid catabolic proce... | 16 | 13 | 5.50 | 125 | 0.00016 |
| 15 | GO:0032787 | monocarboxylic acid metabolic process | 447 | 223 | 153.61 | 22 | 0.00017 |
| 16 | GO:0016557 | peroxisome membrane biogenesis | 8 | 8 | 2.75 | 13 | 0.00019 |
| 17 | GO:0006084 | acetyl-CoA metabolic process | 58 | 37 | 19.93 | 5 | 0.00021 |
| 18 | GO:0006641 | triglyceride metabolic process | 96 | 50 | 32.99 | 9 | 0.00026 |
| 19 | GO:0055072 | iron ion homeostasis | 62 | 35 | 21.31 | 34 | 0.00029 |
| 20 | GO:0042632 | cholesterol homeostasis | 69 | 38 | 23.71 | 64 | 0.00033 |
| 21 | GO:0009068 | aspartate family amino acid catabolic pr... | 10 | 9 | 3.44 | 31 | 0.00046 |
| 22 | GO:0000050 | urea cycle | 10 | 9 | 3.44 | 38 | 0.00046 |
| 23 | GO:0006997 | nucleus organization | 61 | 34 | 20.96 | 44 | 0.00049 |
| 24 | GO:0006732 | coenzyme metabolic process | 237 | 134 | 81.44 | 926 | 0.00051 |
| 25 | GO:0042147 | retrograde transport, endosome to Golgi | 35 | 22 | 12.03 | 60 | 0.00053 |
| 26 | GO:0033539 | fatty acid beta-oxidation using acyl-CoA... | 7 | 7 | 2.41 | 20 | 0.00056 |
| 27 | GO:0009065 | glutamine family amino acid catabolic pr... | 31 | 20 | 10.65 | 8 | 0.00058 |
| 28 | GO:0009108 | coenzyme biosynthetic process | 97 | 53 | 33.33 | 30 | 0.00068 |
| 29 | GO:0006577 | amino-acid betaine metabolic process | 17 | 15 | 5.84 | 180 | 0.00071 |
| 30 | GO:0006591 | ornithine metabolic process | 12 | 10 | 4.12 | 57 | 0.00071 |
| 31 | GO:0006695 | cholesterol biosynthetic process | 53 | 30 | 18.21 | 35 | 0.00073 |
| 32 | GO:0044248 | cellular catabolic process | 1690 | 705 | 580.75 | 102 | 0.00091 |
| 33 | GO:0006107 | oxaloacetate metabolic process | 18 | 13 | 6.19 | 77 | 0.00117 |
| 34 | GO:0090083 | regulation of inclusion body assembly | 9 | 8 | 3.09 | 28 | 0.00121 |
| 35 | GO:0006573 | valine metabolic process | 9 | 8 | 3.09 | 424 | 0.00121 |
| 36 | GO:0009804 | coumarin metabolic process | 9 | 8 | 3.09 | 905 | 0.00121 |
| 37 | GO:0070328 | triglyceride homeostasis | 24 | 16 | 8.25 | 41 | 0.00124 |
| 38 | GO:0009067 | aspartate family amino acid biosynthetic... | 22 | 15 | 7.56 | 82 | 0.00125 |
| 39 | GO:0045599 | negative regulation of fat cell differen... | 48 | 27 | 16.49 | 62 | 0.00152 |
| 40 | GO:0001561 | fatty acid alpha-oxidation | 6 | 6 | 2.06 | 11 | 0.00164 |
| 41 | GO:0002051 | osteoblast fate commitment | 6 | 6 | 2.06 | 47 | 0.00164 |
| 42 | GO:0071679 | commissural neuron axon guidance | 6 | 6 | 2.06 | 99 | 0.00164 |
| 43 | GO:0046060 | dATP metabolic process | 11 | 9 | 3.78 | 32 | 0.00175 |
| 44 | GO:0009074 | aromatic amino acid family catabolic pro... | 11 | 9 | 3.78 | 459 | 0.00175 |
| 45 | GO:0071456 | cellular response to hypoxia | 105 | 51 | 36.08 | 164 | 0.00179 |
| 46 | GO:0042304 | regulation of fatty acid biosynthetic pr... | 33 | 20 | 11.34 | 245 | 0.00181 |
| 47 | GO:0006625 | protein targeting to peroxisome | 27 | 17 | 9.28 | 415 | 0.00223 |
| 48 | GO:0016567 | protein ubiquitination | 516 | 219 | 177.32 | 50 | 0.00228 |
| 49 | GO:0006977 | DNA damage response, signal transduction... | 25 | 16 | 8.59 | 14 | 0.00235 |
| 50 | GO:0015031 | protein transport | 1272 | 490 | 437.11 | 48 | 0.00246 |
| 51 | GO:0034383 | low-density lipoprotein particle clearan... | 24 | 18 | 8.25 | 10 | 0.00249 |
| 52 | GO:0055091 | phospholipid homeostasis | 17 | 12 | 5.84 | 146 | 0.00251 |
| 53 | GO:0017144 | drug metabolic process | 36 | 21 | 12.37 | 33 | 0.00273 |
| 54 | GO:0010243 | response to organic nitrogen | 257 | 110 | 88.31 | 176 | 0.00281 |
| 55 | GO:0032436 | positive regulation of proteasomal ubiq... | 52 | 28 | 17.87 | 96 | 0.00300 |
| 56 | GO:0044255 | cellular lipid metabolic process | 798 | 360 | 274.22 | 42 | 0.00306 |
| 57 | GO:0006563 | L-serine metabolic process | 8 | 7 | 2.75 | 1535 | 0.00316 |
| 58 | GO:0006534 | cysteine metabolic process | 8 | 7 | 2.75 | 25 | 0.00316 |
| 59 | GO:0071377 | cellular response to glucagon stimulus | 8 | 7 | 2.75 | 37 | 0.00316 |
| 60 | GO:0046907 | intracellular transport | 1128 | 450 | 387.62 | 23 | 0.00333 |
| 61 | GO:0070542 | response to fatty acid | 57 | 30 | 19.59 | 839 | 0.00342 |
| 62 | GO:0051591 | response to cAMP | 138 | 63 | 47.42 | 91 | 0.00380 |
| 63 | GO:0045931 | positive regulation of mitotic cell cycl... | 55 | 29 | 18.90 | 123 | 0.00383 |
| 64 | GO:0006805 | xenobiotic metabolic process | 42 | 29 | 14.43 | 80 | 0.00410 |
| 65 | GO:0031396 | regulation of protein ubiquitination | 141 | 64 | 48.45 | 685 | 0.00418 |
| 66 | GO:0031442 | positive regulation of mRNA 3'-end proce... | 10 | 8 | 3.44 | 122 | 0.00422 |

| | GO.ID | Term | Annotated | Significant | Expected | Rank in KS | elim |
|-----|------------|---|-----------|-------------|----------|------------|---------|
| 67 | GO:0001836 | release of cytochrome c from mitochondri... | 60 | 31 | 20.62 | 330 | 0.00426 |
| 68 | GO:0048278 | vesicle docking | 37 | 21 | 12.71 | 49 | 0.00429 |
| 69 | GO:0032482 | Rab protein signal transduction | 24 | 15 | 8.25 | 192 | 0.00447 |
| 70 | GO:0046496 | nicotinamide nucleotide metabolic proces... | 65 | 33 | 22.34 | 1021 | 0.00463 |
| 71 | GO:0043094 | cellular metabolic compound salvage | 22 | 14 | 7.56 | 110 | 0.00476 |
| 72 | GO:0006551 | leucine metabolic process | 5 | 5 | 1.72 | 655 | 0.00479 |
| 73 | GO:0006522 | alanine metabolic process | 5 | 5 | 1.72 | 1772 | 0.00479 |
| 74 | GO:0035522 | monoubiquitinated histone H2A deubiquiti... | 5 | 5 | 1.72 | 140 | 0.00479 |
| 75 | GO:0019482 | beta-alanine metabolic process | 5 | 5 | 1.72 | 29 | 0.00479 |
| 76 | GO:0034111 | negative regulation of homotypic cell-ce... | 5 | 5 | 1.72 | 153 | 0.00479 |
| 77 | GO:0043651 | linoleic acid metabolic process | 5 | 5 | 1.72 | 27 | 0.00479 |
| 78 | GO:0045329 | carnitine biosynthetic process | 5 | 5 | 1.72 | 36 | 0.00479 |
| 79 | GO:0006059 | hexitol metabolic process | 5 | 5 | 1.72 | 120 | 0.00479 |
| 80 | GO:0046173 | polyol biosynthetic process | 12 | 9 | 4.12 | 144 | 0.00486 |
| 81 | GO:0032464 | positive regulation of protein homooligo... | 12 | 9 | 4.12 | 68 | 0.00486 |
| 82 | GO:0006085 | acetyl-CoA biosynthetic process | 12 | 9 | 4.12 | 217 | 0.00486 |
| 83 | GO:0019318 | hexose metabolic process | 303 | 126 | 104.12 | 270 | 0.00490 |
| 84 | GO:0042402 | cellular biogenic amine catabolic proces... | 20 | 13 | 6.87 | 26 | 0.00500 |
| 85 | GO:0001675 | acrosome assembly | 16 | 11 | 5.50 | 86 | 0.00526 |
| 86 | GO:0006631 | fatty acid metabolic process | 342 | 169 | 117.52 | 501 | 0.00552 |
| 87 | GO:0006956 | complement activation | 40 | 22 | 13.75 | 70 | 0.00583 |
| 88 | GO:0016485 | protein processing | 120 | 55 | 41.24 | 210 | 0.00592 |
| 89 | GO:0006979 | response to oxidative stress | 366 | 162 | 125.77 | 115 | 0.00593 |
| 90 | GO:0042559 | pteridine-containing compound biosynthes... | 29 | 17 | 9.97 | 66 | 0.00638 |
| 91 | GO:0018208 | peptidyl-proline modification | 29 | 17 | 9.97 | 160 | 0.00638 |
| 92 | GO:0051893 | regulation of focal adhesion assembly | 29 | 17 | 9.97 | 188 | 0.00638 |
| 93 | GO:0070265 | necrotic cell death | 27 | 16 | 9.28 | 317 | 0.00700 |
| 94 | GO:0009084 | glutamine family amino acid biosynthetic... | 27 | 16 | 9.28 | 152 | 0.00700 |
| 95 | GO:0008203 | cholesterol metabolic process | 130 | 70 | 44.67 | 69 | 0.00701 |
| 96 | GO:2000379 | positive regulation of reactive oxygen s... | 36 | 20 | 12.37 | 239 | 0.00727 |
| 97 | GO:0008610 | lipid biosynthetic process | 512 | 218 | 175.94 | 1799 | 0.00727 |
| 98 | GO:0009060 | aerobic respiration | 43 | 23 | 14.78 | 225 | 0.00762 |
| 99 | GO:0010038 | response to metal ion | 441 | 181 | 151.54 | 398 | 0.00794 |
| 100 | GO:0046485 | ether lipid metabolic process | 7 | 6 | 2.41 | 1326 | 0.00812 |

La tabella mostra per ogni categoria ontologica genica (GO.ID) il numero di geni in essa contenuti (*Annotated*), il numero di geni significativamente modulati (*Significant*), il numero di geni attesi considerando il numero totale di geni modulati (*Expected*), e valori di probabilità (*elim* e KS). Le categorie ontologiche sono disposte in tabella partendo da quella statisticamente più significativa secondo il valore di probabilità *elim*.

**TABELLA 10.14. ANALISI ONTOLOGICA DEI GENI
SIGNIFICATIVAMENTE MODULATI DALL' INDOLO-3-CARBINOLO**

| | GO.ID | Term | Annotated | Significant | Expected | Rank in KS | elim |
|----|------------|---|-----------|-------------|----------|------------|---------|
| 1 | GO:0070936 | protein K48-linked ubiquitination | 60 | 26 | 11.38 | 1 | 1.2e-05 |
| 2 | GO:006397 | mRNA processing | 328 | 100 | 62.23 | 2 | 1.5e-05 |
| 3 | GO:0043966 | histone H3 acetylation | 63 | 26 | 11.95 | 18 | 3.5e-05 |
| 4 | GO:0008380 | RNA splicing | 265 | 77 | 50.27 | 9 | 4.0e-05 |
| 5 | GO:0042787 | protein ubiquitination involved in ubiqu... | 75 | 29 | 14.23 | 5 | 5.4e-05 |
| 6 | GO:0071157 | negative regulation of cell cycle arrest | 13 | 9 | 2.47 | 24 | 0.00011 |
| 7 | GO:0010269 | response to selenium ion | 21 | 12 | 3.98 | 3 | 0.00011 |
| 8 | GO:0008652 | cellular amino acid biosynthetic process | 117 | 51 | 22.20 | 12 | 0.00017 |
| 9 | GO:0070534 | protein K63-linked ubiquitination | 48 | 20 | 9.11 | 7 | 0.00024 |
| 10 | GO:0043651 | linoleic acid metabolic process | 5 | 5 | 0.95 | 20 | 0.00025 |
| 11 | GO:0090267 | positive regulation of mitotic cell cycl... | 7 | 6 | 1.33 | 15 | 0.00027 |
| 12 | GO:0009396 | follic acid-containing compound biosynthe... | 17 | 10 | 3.23 | 35 | 0.00031 |
| 13 | GO:0042402 | cellular biosynthetic amine catabolic proces... | 20 | 11 | 3.79 | 83 | 0.00035 |
| 14 | GO:0009086 | methionine biosynthetic process | 15 | 9 | 2.85 | 51 | 0.00052 |
| 15 | GO:0051443 | positive regulation of ubiquitin-protein... | 18 | 10 | 3.41 | 22 | 0.00058 |
| 16 | GO:0042760 | very long-chain fatty acid catabolic pro... | 10 | 7 | 1.90 | 42 | 0.00061 |
| 17 | GO:0042737 | drug catabolic process | 10 | 7 | 1.90 | 47 | 0.00061 |
| 18 | GO:0016567 | protein ubiquitination | 516 | 156 | 97.89 | 23 | 0.00082 |
| 19 | GO:0009063 | cellular amino acid catabolic process | 98 | 44 | 18.59 | 71 | 0.00087 |
| 20 | GO:0071377 | cellular response to glucagon stimulus | 8 | 6 | 1.52 | 92 | 0.00091 |
| 21 | GO:0006637 | acyl-CoA metabolic process | 33 | 17 | 6.26 | 78 | 0.00093 |
| 22 | GO:0019369 | arachidonic acid metabolic process | 25 | 12 | 4.74 | 86 | 0.00094 |
| 23 | GO:0046653 | tetrahydrofolate metabolic process | 19 | 12 | 3.60 | 10 | 0.00098 |
| 24 | GO:0016926 | protein desumoylation | 6 | 5 | 1.14 | 43 | 0.00124 |
| 25 | GO:0006565 | L-serine catabolic process | 4 | 4 | 0.76 | 66 | 0.00129 |
| 26 | GO:0090346 | cellular organofluorine metabolic proces... | 4 | 4 | 0.76 | 64 | 0.00129 |
| 27 | GO:0090141 | positive regulation of mitochondrial fis... | 4 | 4 | 0.76 | 38 | 0.00129 |
| 28 | GO:0006235 | dTTP biosynthetic process | 4 | 4 | 0.76 | 26 | 0.00129 |
| 29 | GO:0006635 | fatty acid beta-oxidation | 72 | 28 | 13.66 | 11 | 0.00130 |
| 30 | GO:0008203 | cholesterol metabolic process | 130 | 39 | 24.66 | 190 | 0.00157 |
| 31 | GO:0050667 | homocysteine metabolic process | 14 | 8 | 2.66 | 179 | 0.00167 |
| 32 | GO:0006577 | amino-acid betaine metabolic process | 17 | 9 | 3.23 | 81 | 0.00174 |
| 33 | GO:0046856 | phosphatidylinositol dephosphorylation | 17 | 9 | 3.23 | 70 | 0.00174 |
| 34 | GO:0055114 | oxidation-reduction process | 454 | 132 | 86.13 | 27 | 0.00184 |
| 35 | GO:0009064 | glutamine family amino acid metabolic pr... | 77 | 29 | 14.61 | 57 | 0.00199 |
| 36 | GO:0006261 | DNA-dependent DNA replication | 75 | 25 | 14.23 | 137 | 0.00219 |
| 37 | GO:0006418 | tRNA aminoacylation for protein translat... | 52 | 19 | 9.86 | 8 | 0.00221 |
| 38 | GO:0022406 | membrane docking | 45 | 17 | 8.54 | 155 | 0.00246 |
| 39 | GO:0006591 | ornithine metabolic process | 12 | 7 | 2.28 | 256 | 0.00283 |
| 40 | GO:0015936 | coenzyme A metabolic process | 15 | 8 | 2.85 | 139 | 0.00298 |
| 41 | GO:0009698 | phenylpropanoid metabolic process | 15 | 8 | 2.85 | 6835 | 0.00298 |
| 42 | GO:0046686 | response to cadmium ion | 65 | 22 | 12.33 | 449 | 0.00317 |
| 43 | GO:0071453 | cellular response to oxygen levels | 118 | 35 | 22.39 | 232 | 0.00326 |
| 44 | GO:0010898 | positive regulation of triglyceride cata... | 7 | 5 | 1.33 | 152 | 0.00365 |
| 45 | GO:0033539 | fatty acid beta-oxidation using acyl-CoA... | 7 | 5 | 1.33 | 48 | 0.00365 |
| 46 | GO:0010827 | regulation of glucose transport | 86 | 27 | 16.32 | 700 | 0.00390 |
| 47 | GO:0071158 | positive regulation of cell cycle arrest | 43 | 16 | 8.16 | 509 | 0.00390 |
| 48 | GO:0043648 | dicarboxylic acid metabolic process | 70 | 23 | 13.28 | 13 | 0.00396 |
| 49 | GO:0006511 | ubiquitin-dependent protein catabolic pr... | 419 | 119 | 79.49 | 4 | 0.00426 |
| 50 | GO:2001020 | regulation of response to DNA damage sti... | 99 | 30 | 18.78 | 151 | 0.00437 |
| 51 | GO:0072329 | monocarboxylic acid catabolic process | 96 | 41 | 18.21 | 261 | 0.00439 |
| 52 | GO:0009070 | serine family amino acid biosynthetic pr... | 15 | 11 | 2.85 | 168 | 0.00478 |
| 53 | GO:0043414 | macromolecule methylation | 142 | 40 | 26.94 | 413 | 0.00480 |
| 54 | GO:0000278 | mitotic cell cycle | 620 | 149 | 117.62 | 605 | 0.00481 |
| 55 | GO:0000050 | urea cycle | 10 | 6 | 1.90 | 238 | 0.00482 |
| 56 | GO:0042135 | neurotransmitter catabolic process | 10 | 6 | 1.90 | 40 | 0.00482 |
| 57 | GO:0032261 | purine nucleotide salvage | 10 | 6 | 1.90 | 282 | 0.00482 |
| 58 | GO:0006188 | IMP biosynthetic process | 10 | 6 | 1.90 | 283 | 0.00482 |
| 59 | GO:0042304 | regulation of fatty acid biosynthetic pr... | 33 | 13 | 6.26 | 17 | 0.00511 |
| 60 | GO:0019321 | pentose metabolic process | 13 | 7 | 2.47 | 145 | 0.00514 |
| 61 | GO:0070989 | oxidative demethylation | 13 | 7 | 2.47 | 85 | 0.00514 |
| 62 | GO:0046855 | inositol phosphate dephosphorylation | 13 | 7 | 2.47 | 28 | 0.00514 |
| 63 | GO:0042770 | signal transduction in response to DNA d... | 113 | 33 | 21.44 | 2217 | 0.00545 |
| 64 | GO:0006547 | histidine metabolic process | 5 | 4 | 0.95 | 171 | 0.00549 |
| 65 | GO:0071400 | cellular response to oleic acid | 5 | 4 | 0.95 | 129 | 0.00549 |
| 66 | GO:0031848 | protection from non-homologous end joini... | 5 | 4 | 0.95 | 185 | 0.00549 |

| | GO.ID | Term | Annotated | Significant | Expected | Rank in KS | elim |
|-----|------------|---|-----------|-------------|----------|------------|---------|
| 67 | GO:0060564 | negative regulation of mitotic anaphase-... | 5 | 4 | 0.95 | 46 | 0.00549 |
| 68 | GO:0090169 | regulation of spindle assembly | 5 | 4 | 0.95 | 68 | 0.00549 |
| 69 | GO:0016098 | monoterpenoid metabolic process | 5 | 4 | 0.95 | 60 | 0.00549 |
| 70 | GO:0090234 | regulation of kinetochore assembly | 5 | 4 | 0.95 | 69 | 0.00549 |
| 71 | GO:0002538 | arachidonic acid metabolite production i... | 5 | 4 | 0.95 | 247 | 0.00549 |
| 72 | GO:2000124 | regulation of endocannabinoid signaling ... | 5 | 4 | 0.95 | 122 | 0.00549 |
| 73 | GO:0090305 | nucleic acid phosphodiester bond hydroly... | 80 | 25 | 15.18 | 96 | 0.00572 |
| 74 | GO:0046364 | monosaccharide biosynthetic process | 72 | 23 | 13.66 | 255 | 0.00584 |
| 75 | GO:0000184 | nuclear-transcribed mRNA catabolic proce... | 30 | 12 | 5.69 | 41 | 0.00611 |
| 76 | GO:0031124 | mRNA 3'-end processing | 41 | 15 | 7.78 | 303 | 0.00615 |
| 77 | GO:0022403 | cell cycle phase | 672 | 164 | 127.49 | 645 | 0.00617 |
| 78 | GO:0006564 | L-serine biosynthetic process | 3 | 3 | 0.57 | 153 | 0.00682 |
| 79 | GO:0006552 | leucine catabolic process | 3 | 3 | 0.57 | 159 | 0.00682 |
| 80 | GO:0097089 | methyl-branched fatty acid metabolic pro... | 3 | 3 | 0.57 | 74 | 0.00682 |
| 81 | GO:0071301 | cellular response to vitamin B1 | 3 | 3 | 0.57 | 90 | 0.00682 |
| 82 | GO:0071494 | cellular response to UV-C | 3 | 3 | 0.57 | 91 | 0.00682 |
| 83 | GO:0010032 | meiotic chromosome condensation | 3 | 3 | 0.57 | 230 | 0.00682 |
| 84 | GO:0061043 | regulation of vascular wound healing | 3 | 3 | 0.57 | 207 | 0.00682 |
| 85 | GO:0019264 | glycine biosynthetic process from serine | 3 | 3 | 0.57 | 205 | 0.00682 |
| 86 | GO:0000053 | argininosuccinate metabolic process | 3 | 3 | 0.57 | 118 | 0.00682 |
| 87 | GO:0048669 | collateral sprouting in absence of injur... | 3 | 3 | 0.57 | 73 | 0.00682 |
| 88 | GO:0042443 | phenylethylamine metabolic process | 3 | 3 | 0.57 | 219 | 0.00682 |
| 89 | GO:0000101 | sulfur amino acid transport | 3 | 3 | 0.57 | 89 | 0.00682 |
| 90 | GO:0035694 | mitochondrial protein catabolic process | 3 | 3 | 0.57 | 112 | 0.00682 |
| 91 | GO:0009822 | alkaloid catabolic process | 3 | 3 | 0.57 | 102 | 0.00682 |
| 92 | GO:0033512 | L-lysine catabolic process to acetyl-CoA... | 3 | 3 | 0.57 | 194 | 0.00682 |
| 93 | GO:0042853 | L-alanine catabolic process | 3 | 3 | 0.57 | 128 | 0.00682 |
| 94 | GO:0035999 | tetrahydrofolate interconversion | 3 | 3 | 0.57 | 154 | 0.00682 |
| 95 | GO:0006196 | AMP catabolic process | 3 | 3 | 0.57 | 221 | 0.00682 |
| 96 | GO:0046496 | nicotinamide nucleotide metabolic proces... | 65 | 21 | 12.33 | 465 | 0.00713 |
| 97 | GO:2001141 | regulation of RNA biosynthetic process | 2628 | 547 | 498.56 | 158 | 0.00722 |
| 98 | GO:0050685 | positive regulation of mRNA processing | 17 | 8 | 3.23 | 779 | 0.00786 |
| 99 | GO:0055091 | phospholipid homeostasis | 17 | 8 | 3.23 | 554 | 0.00786 |
| 100 | GO:0006354 | DNA-dependent transcription, elongation | 42 | 15 | 7.97 | 169 | 0.00792 |

La tabella mostra per ogni categoria ontologica genica (GO.ID) il numero di geni in essa contenuti (*Annotated*), il numero di geni significativamente modulati (*Significant*), il numero di geni attesi considerando il numero totale di geni modulati (*Expected*), e valori di probabilità (*elim* e KS). Le categorie ontologiche sono disposte in tabella partendo da quella statisticamente più significativa secondo il valore di probabilità *elim*.

**TABELLA 10.15. ANALISI ONTOLOGICA DEI GENI
SIGNIFICATIVAMENTE MODULATI DALLA GLUCORAFANINA**

| GO.ID | Term | Annotated | Significant | Expected | Rank in KS | elim | |
|-------|------------|---|-------------|----------|------------|-------|---------|
| 1 | GO:0071896 | protein localization to adherens junctio... | 5 | 4 | 0.32 | 12 | 8e-05 |
| 2 | GO:0006196 | AMP catabolic process | 3 | 3 | 0.19 | 11 | 0.00026 |
| 3 | GO:0007029 | endoplasmic reticulum organization | 31 | 8 | 1.99 | 402 | 0.00058 |
| 4 | GO:0072307 | regulation of metanephric nephron tubule... | 4 | 3 | 0.26 | 7 | 0.00100 |
| 5 | GO:0072108 | positive regulation of mesenchymal to ep... | 4 | 3 | 0.26 | 3 | 0.00100 |
| 6 | GO:0048251 | elastic fiber assembly | 10 | 4 | 0.64 | 632 | 0.00259 |
| 7 | GO:0034454 | microtubule anchoring at centrosome | 10 | 4 | 0.64 | 74 | 0.00259 |
| 8 | GO:0033631 | cell-cell adhesion mediated by integrin | 16 | 5 | 1.03 | 710 | 0.00259 |
| 9 | GO:0070830 | tight junction assembly | 31 | 7 | 1.99 | 717 | 0.00295 |
| 10 | GO:0007067 | mitosis | 287 | 31 | 18.41 | 791 | 0.00308 |
| 11 | GO:0030010 | establishment of cell polarity | 78 | 12 | 5.00 | 1610 | 0.00389 |
| 12 | GO:0031937 | positive regulation of chromatin silenci... | 2 | 2 | 0.13 | 204 | 0.00411 |
| 13 | GO:0019049 | evasion or tolerance of host defenses by... | 2 | 2 | 0.13 | 155 | 0.00411 |
| 14 | GO:1900212 | negative regulation of mesenchymal cell ... | 2 | 2 | 0.13 | 182 | 0.00411 |
| 15 | GO:1900215 | negative regulation of apoptotic process... | 2 | 2 | 0.13 | 183 | 0.00411 |
| 16 | GO:1900218 | negative regulation of apoptotic process... | 2 | 2 | 0.13 | 184 | 0.00411 |
| 17 | GO:2000594 | positive regulation of metanephric DCT c... | 2 | 2 | 0.13 | 185 | 0.00411 |
| 18 | GO:0072305 | negative regulation of mesenchymal cell ... | 2 | 2 | 0.13 | 186 | 0.00411 |
| 19 | GO:2000612 | regulation of thyroid-stimulating hormon... | 2 | 2 | 0.13 | 187 | 0.00411 |
| 20 | GO:0046086 | adenosine biosynthetic process | 2 | 2 | 0.13 | 140 | 0.00411 |
| 21 | GO:0010961 | cellular magnesium ion homeostasis | 2 | 2 | 0.13 | 110 | 0.00411 |
| 22 | GO:0039003 | pronephric field specification | 2 | 2 | 0.13 | 188 | 0.00411 |
| 23 | GO:0071539 | protein localization to centrosome | 6 | 3 | 0.38 | 20 | 0.00455 |
| 24 | GO:0015696 | ammonium transport | 6 | 3 | 0.38 | 654 | 0.00455 |
| 25 | GO:0000239 | pachytene | 6 | 3 | 0.38 | 647 | 0.00455 |
| 26 | GO:0045216 | cell-cell junction organization | 122 | 20 | 7.83 | 4033 | 0.00498 |
| 27 | GO:0022027 | interkinetic nuclear migration | 12 | 4 | 0.77 | 454 | 0.00550 |
| 28 | GO:0016197 | endosomal transport | 135 | 17 | 8.66 | 242 | 0.00577 |
| 29 | GO:0030225 | macrophage differentiation | 27 | 6 | 1.73 | 1575 | 0.00634 |
| 30 | GO:0017144 | drug metabolic process | 36 | 7 | 2.31 | 389 | 0.00709 |
| 31 | GO:0060271 | cilium morphogenesis | 105 | 14 | 6.74 | 342 | 0.00710 |
| 32 | GO:0043129 | surfactant homeostasis | 13 | 4 | 0.83 | 619 | 0.00754 |
| 33 | GO:0043011 | myeloid dendritic cell differentiation | 13 | 4 | 0.83 | 825 | 0.00754 |
| 34 | GO:0045835 | negative regulation of meiosis | 7 | 3 | 0.45 | 973 | 0.00758 |
| 35 | GO:0014063 | negative regulation of serotonin secreti... | 7 | 3 | 0.45 | 924 | 0.00758 |
| 36 | GO:0007346 | regulation of mitotic cell cycle | 307 | 31 | 19.69 | 960 | 0.00820 |
| 37 | GO:0008156 | negative regulation of DNA replication | 46 | 8 | 2.95 | 422 | 0.00823 |
| 38 | GO:0045767 | regulation of anti-apoptosis | 87 | 12 | 5.58 | 408 | 0.00938 |
| 39 | GO:0034332 | adherens junction organization | 30 | 6 | 1.92 | 511 | 0.01079 |
| 40 | GO:0046823 | negative regulation of nucleocytoplasmic... | 58 | 9 | 3.72 | 3549 | 0.01104 |
| 41 | GO:0044319 | wound healing, spreading of cells | 22 | 5 | 1.41 | 824 | 0.01133 |
| 42 | GO:0051645 | Golgi localization | 22 | 5 | 1.41 | 945 | 0.01133 |
| 43 | GO:0072278 | metanephric comma-shaped body morphogene... | 8 | 3 | 0.51 | 628 | 0.01155 |
| 44 | GO:0001554 | luteolysis | 8 | 3 | 0.51 | 47 | 0.01155 |
| 45 | GO:0050832 | defense response to fungus | 8 | 3 | 0.51 | 1203 | 0.01155 |
| 46 | GO:0007262 | STAT protein import into nucleus | 8 | 3 | 0.51 | 1289 | 0.01155 |
| 47 | GO:1900125 | regulation of hyaluronan biosynthetic pr... | 3 | 2 | 0.19 | 648 | 0.01181 |
| 48 | GO:0060290 | transdifferentiation | 3 | 2 | 0.19 | 793 | 0.01181 |
| 49 | GO:0072289 | metanephric nephron tubule formation | 3 | 2 | 0.19 | 890 | 0.01181 |
| 50 | GO:0003223 | ventricular compact myocardium morphogen... | 3 | 2 | 0.19 | 701 | 0.01181 |
| 51 | GO:0036093 | germ cell proliferation | 3 | 2 | 0.19 | 278 | 0.01181 |
| 52 | GO:0002176 | male germ cell proliferation | 3 | 2 | 0.19 | 279 | 0.01181 |
| 53 | GO:0045022 | early endosome to late endosome transpor... | 31 | 6 | 1.99 | 1788 | 0.01267 |
| 54 | GO:0051894 | positive regulation of focal adhesion as... | 15 | 4 | 0.96 | 2065 | 0.01299 |
| 55 | GO:0035088 | establishment or maintenance of apical/b... | 23 | 5 | 1.48 | 531 | 0.01373 |
| 56 | GO:0033687 | osteoblast proliferation | 23 | 5 | 1.48 | 2844 | 0.01373 |
| 57 | GO:0061245 | establishment or maintenance of bipolar ... | 23 | 5 | 1.48 | 532 | 0.01373 |
| 58 | GO:0071478 | cellular response to radiation | 93 | 12 | 5.97 | 291 | 0.01555 |
| 59 | GO:0042130 | negative regulation of T cell proliferat... | 42 | 7 | 2.69 | 1466 | 0.01643 |
| 60 | GO:0030195 | negative regulation of blood coagulation | 24 | 5 | 1.54 | 2045 | 0.01644 |
| 61 | GO:1900047 | negative regulation of hemostasis | 24 | 5 | 1.54 | 2046 | 0.01644 |
| 62 | GO:0072163 | mesonephric epithelium development | 16 | 4 | 1.03 | 1398 | 0.01646 |
| 63 | GO:0071158 | positive regulation of cell cycle arrest | 43 | 7 | 2.76 | 8833 | 0.01857 |
| 64 | GO:0006977 | DNA damage response, signal transduction... | 25 | 5 | 1.60 | 1 | 0.01950 |
| 65 | GO:0072474 | signal transduction involved in mitotic ... | 25 | 5 | 1.60 | 11140 | 0.01950 |
| 66 | GO:0072413 | signal transduction involved in mitotic ... | 25 | 5 | 1.60 | 11141 | 0.01950 |

| | GO.ID | Term | Annotated | Significant | Expected | Rank in KS | elim |
|-----|------------|---|-----------|-------------|----------|------------|---------|
| 67 | GO:0072431 | signal transduction involved in mitotic ... | 25 | 5 | 1.60 | 11142 | 0.01950 |
| 68 | GO:0060216 | definitive hemopoiesis | 34 | 6 | 2.18 | 2102 | 0.01968 |
| 69 | GO:0072358 | cardiovascular system development | 1065 | 85 | 68.32 | 1444 | 0.02008 |
| 70 | GO:0072359 | circulatory system development | 1065 | 85 | 68.32 | 1445 | 0.02008 |
| 71 | GO:0001890 | placenta development | 166 | 18 | 10.65 | 3919 | 0.02008 |
| 72 | GO:0001944 | vasculature development | 692 | 58 | 44.39 | 2520 | 0.02156 |
| 73 | GO:0090068 | positive regulation of cell cycle proces... | 144 | 16 | 9.24 | 4938 | 0.02229 |
| 74 | GO:0033240 | positive regulation of cellular amine me... | 10 | 3 | 0.64 | 92 | 0.02247 |
| 75 | GO:0060896 | neural plate pattern specification | 10 | 3 | 0.64 | 1130 | 0.02247 |
| 76 | GO:0042737 | drug catabolic process | 10 | 3 | 0.64 | 1075 | 0.02247 |
| 77 | GO:0048170 | positive regulation of long-term neurona... | 10 | 3 | 0.64 | 2263 | 0.02247 |
| 78 | GO:0072049 | comma-shaped body morphogenesis | 10 | 3 | 0.64 | 1172 | 0.02247 |
| 79 | GO:0006926 | virus-infected cell apoptotic process | 4 | 2 | 0.26 | 1199 | 0.02261 |
| 80 | GO:0014719 | satellite cell activation | 4 | 2 | 0.26 | 1492 | 0.02261 |
| 81 | GO:0002934 | desmosome organization | 4 | 2 | 0.26 | 145 | 0.02261 |
| 82 | GO:0016476 | regulation of embryonic cell shape | 4 | 2 | 0.26 | 167 | 0.02261 |
| 83 | GO:0050862 | positive regulation of T cell receptor s... | 4 | 2 | 0.26 | 1623 | 0.02261 |
| 84 | GO:0070940 | dephosphorylation of RNA polymerase II C... | 4 | 2 | 0.26 | 716 | 0.02261 |
| 85 | GO:0010593 | negative regulation of lamellipodium ass... | 4 | 2 | 0.26 | 1457 | 0.02261 |
| 86 | GO:0042986 | positive regulation of amyloid precursor... | 4 | 2 | 0.26 | 117 | 0.02261 |
| 87 | GO:0034379 | very-low-density lipoprotein particle as... | 4 | 2 | 0.26 | 1672 | 0.02261 |
| 88 | GO:0007088 | regulation of mitosis | 98 | 12 | 6.29 | 348 | 0.02270 |
| 89 | GO:0051783 | regulation of nuclear division | 98 | 12 | 6.29 | 349 | 0.02270 |
| 90 | GO:0072422 | signal transduction involved in DNA dama... | 26 | 5 | 1.67 | 4872 | 0.02290 |
| 91 | GO:0072401 | signal transduction involved in DNA inte... | 26 | 5 | 1.67 | 4873 | 0.02290 |
| 92 | GO:0072404 | signal transduction involved in G1/S tra... | 26 | 5 | 1.67 | 5366 | 0.02290 |
| 93 | GO:0009311 | oligosaccharide metabolic process | 26 | 5 | 1.67 | 109 | 0.02290 |
| 94 | GO:0006302 | double-strand break repair | 121 | 14 | 7.76 | 4914 | 0.02291 |
| 95 | GO:0050920 | regulation of chemotaxis | 121 | 14 | 7.76 | 604 | 0.02291 |
| 96 | GO:0019080 | viral genome expression | 45 | 7 | 2.89 | 2701 | 0.02343 |
| 97 | GO:0019083 | viral transcription | 45 | 7 | 2.89 | 2702 | 0.02343 |
| 98 | GO:0006906 | vesicle fusion | 45 | 7 | 2.89 | 3349 | 0.02343 |
| 99 | GO:0071479 | cellular response to ionizing radiation | 45 | 7 | 2.89 | 339 | 0.02343 |
| 100 | GO:0050848 | regulation of calcium-mediated signaling | 45 | 7 | 2.89 | 753 | 0.02343 |

La tabella mostra per ogni categoria ontologica genica (GO.ID) il numero di geni in essa contenuti (*Annotated*), il numero di geni significativamente modulati (*Significant*), il numero di geni attesi considerando il numero totale di geni modulati (*Expected*), e valori di probabilità (*elim* e KS). Le categorie ontologiche sono disposte in tabella partendo da quella statisticamente più significativa secondo il valore di probabilità *elim*.

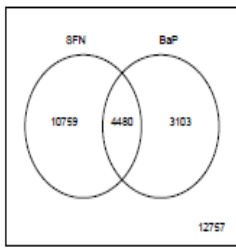
**TABELLA 10.16. ANALISI ONTOLOGICA DEI GENI
SIGNIFICATIVAMENTE MODULATI DAL BENZO(a)PIRENE**

| | GO.ID | Term | Annotated | Significant | Expected | Rank in KS | elim |
|----|------------|---|-----------|-------------|----------|------------|---------|
| 1 | GO:0009063 | cellular amino acid catabolic process | 98 | 59 | 27.03 | 1 | 9.8e-07 |
| 2 | GO:0006695 | cholesterol biosynthetic process | 53 | 29 | 14.62 | 16 | 2.8e-05 |
| 3 | GO:0019439 | aromatic compound catabolic process | 27 | 20 | 7.45 | 11 | 3.6e-05 |
| 4 | GO:0010269 | response to selenium ion | 21 | 15 | 5.79 | 6 | 3.6e-05 |
| 5 | GO:0006805 | xenobiotic metabolic process | 42 | 24 | 11.59 | 10 | 5.3e-05 |
| 6 | GO:0000050 | urea cycle | 10 | 9 | 2.76 | 2 | 6.9e-05 |
| 7 | GO:0006084 | acetyl-CoA metabolic process | 58 | 30 | 16.00 | 24 | 8.3e-05 |
| 8 | GO:0008203 | cholesterol metabolic process | 130 | 66 | 35.86 | 17 | 9.3e-05 |
| 9 | GO:0051591 | response to cAMP | 138 | 63 | 38.07 | 7 | 0.00011 |
| 10 | GO:0051918 | negative regulation of fibrinolysis | 7 | 7 | 1.93 | 14 | 0.00012 |
| 11 | GO:0010898 | positive regulation of triglyceride cata... | 7 | 7 | 1.93 | 15 | 0.00012 |
| 12 | GO:0019915 | lipid storage | 58 | 32 | 16.00 | 505 | 0.00013 |
| 13 | GO:0006749 | glutathione metabolic process | 47 | 25 | 12.96 | 23 | 0.00018 |
| 14 | GO:0006596 | polyamine biosynthetic process | 9 | 8 | 2.48 | 431 | 0.00023 |
| 15 | GO:0006699 | bile acid biosynthetic process | 17 | 12 | 4.69 | 28 | 0.00028 |
| 16 | GO:0009070 | serine family amino acid biosynthetic pr... | 15 | 11 | 4.14 | 63 | 0.00030 |
| 17 | GO:0009437 | carnitine metabolic process | 13 | 10 | 3.59 | 8 | 0.00031 |
| 18 | GO:0051289 | protein homotrimerization | 78 | 36 | 21.52 | 9 | 0.00034 |
| 19 | GO:0010043 | response to zinc ion | 54 | 27 | 14.90 | 45 | 0.00038 |
| 20 | GO:0055088 | lipid homeostasis | 104 | 45 | 28.69 | 106 | 0.00041 |
| 21 | GO:0019676 | ammonia assimilation cycle | 6 | 6 | 1.66 | 42 | 0.00044 |
| 22 | GO:0046479 | glycosphingolipid catabolic process | 6 | 6 | 1.66 | 62 | 0.00044 |
| 23 | GO:0045337 | farnesyl diphosphate biosynthetic proces... | 6 | 6 | 1.66 | 55 | 0.00044 |
| 24 | GO:0032787 | monocarboxylic acid metabolic process | 447 | 185 | 123.30 | 5 | 0.00053 |
| 25 | GO:0033700 | phospholipid efflux | 16 | 11 | 4.41 | 12 | 0.00072 |
| 26 | GO:0006563 | L-serine metabolic process | 8 | 7 | 2.21 | 82 | 0.00074 |
| 27 | GO:0006642 | triglyceride mobilization | 8 | 7 | 2.21 | 19 | 0.00074 |
| 28 | GO:0042866 | pyruvate biosynthetic process | 8 | 7 | 2.21 | 93 | 0.00074 |
| 29 | GO:0006397 | mRNA processing | 328 | 134 | 90.48 | 4 | 0.00074 |
| 30 | GO:0097066 | response to thyroid hormone stimulus | 23 | 14 | 6.34 | 126 | 0.00084 |
| 31 | GO:0006544 | glycine metabolic process | 21 | 16 | 5.79 | 25 | 0.00085 |
| 32 | GO:0021670 | lateral ventricle development | 10 | 8 | 2.76 | 32 | 0.00086 |
| 33 | GO:0006241 | CTP biosynthetic process | 12 | 9 | 3.31 | 26 | 0.00086 |
| 34 | GO:0008652 | cellular amino acid biosynthetic process | 117 | 59 | 32.27 | 18 | 0.00115 |
| 35 | GO:0006767 | water-soluble vitamin metabolic process | 26 | 15 | 7.17 | 95 | 0.00119 |
| 36 | GO:0042254 | ribosome biogenesis | 127 | 51 | 35.03 | 108 | 0.00141 |
| 37 | GO:0010613 | positive regulation of cardiac muscle hy... | 17 | 11 | 4.69 | 64 | 0.00152 |
| 38 | GO:0043651 | linoleic acid metabolic process | 5 | 5 | 1.38 | 30 | 0.00159 |
| 39 | GO:0006551 | leucine metabolic process | 5 | 5 | 1.38 | 31 | 0.00159 |
| 40 | GO:0008215 | spermine metabolic process | 5 | 5 | 1.38 | 623 | 0.00159 |
| 41 | GO:0046104 | thymidine metabolic process | 5 | 5 | 1.38 | 51 | 0.00159 |
| 42 | GO:0042126 | nitrate metabolic process | 5 | 5 | 1.38 | 21 | 0.00159 |
| 43 | GO:0019482 | beta-alanine metabolic process | 5 | 5 | 1.38 | 13 | 0.00159 |
| 44 | GO:0046931 | pore complex assembly | 5 | 5 | 1.38 | 1216 | 0.00159 |
| 45 | GO:0019318 | hexose metabolic process | 303 | 107 | 83.58 | 603 | 0.00178 |
| 46 | GO:0046838 | phosphorylated carbohydrate dephosphoryl... | 15 | 10 | 4.14 | 84 | 0.00182 |
| 47 | GO:0009698 | phenylpropanoid metabolic process | 15 | 10 | 4.14 | 44 | 0.00182 |
| 48 | GO:0034435 | cholesterol esterification | 15 | 10 | 4.14 | 72 | 0.00182 |
| 49 | GO:0009108 | coenzyme biosynthetic process | 97 | 48 | 26.76 | 100 | 0.00189 |
| 50 | GO:0043407 | negative regulation of MAP kinase activi... | 73 | 32 | 20.14 | 176 | 0.00205 |
| 51 | GO:0042953 | lipoprotein transport | 13 | 9 | 3.59 | 47 | 0.00212 |
| 52 | GO:0034629 | cellular protein complex localization | 13 | 9 | 3.59 | 128 | 0.00212 |
| 53 | GO:0046112 | nucleobase biosynthetic process | 13 | 9 | 3.59 | 862 | 0.00212 |
| 54 | GO:0009071 | serine family amino acid catabolic proce... | 16 | 13 | 4.41 | 50 | 0.00233 |
| 55 | GO:0015693 | magnesium ion transport | 7 | 6 | 1.93 | 38 | 0.00235 |
| 56 | GO:0010745 | negative regulation of macrophage derive... | 7 | 6 | 1.93 | 127 | 0.00235 |
| 57 | GO:0033590 | response to cobalamin | 7 | 6 | 1.93 | 125 | 0.00235 |
| 58 | GO:0097035 | regulation of membrane lipid distributio... | 7 | 6 | 1.93 | 107 | 0.00235 |
| 59 | GO:0042402 | cellular biogenic amine catabolic proces... | 20 | 12 | 5.52 | 58 | 0.00236 |
| 60 | GO:0046060 | dATP metabolic process | 11 | 8 | 3.03 | 87 | 0.00238 |
| 61 | GO:0046051 | UTP metabolic process | 11 | 8 | 3.03 | 1063 | 0.00238 |
| 62 | GO:0006167 | AMP biosynthetic process | 11 | 8 | 3.03 | 155 | 0.00238 |
| 63 | GO:0034392 | negative regulation of smooth muscle cel... | 11 | 8 | 3.03 | 156 | 0.00238 |
| 64 | GO:0051131 | chaperone-mediated protein complex assem... | 11 | 8 | 3.03 | 193 | 0.00238 |
| 65 | GO:0005977 | glycogen metabolic process | 97 | 40 | 26.76 | 208 | 0.00249 |
| 66 | GO:0030194 | positive regulation of blood coagulation | 16 | 14 | 4.41 | 40 | 0.00249 |

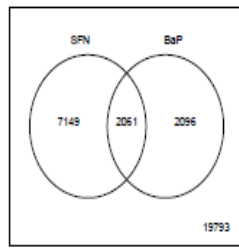
| | GO.ID | Term | Annotated | Significant | Expected | Rank in KS | elim |
|-----|------------|---|-----------|-------------|----------|------------|---------|
| 67 | GO:0055114 | oxidation-reduction process | 454 | 172 | 125.23 | 46 | 0.00251 |
| 68 | GO:0006379 | mRNA cleavage | 9 | 7 | 2.48 | 159 | 0.00251 |
| 69 | GO:0006183 | GTP biosynthetic process | 9 | 7 | 2.48 | 27 | 0.00251 |
| 70 | GO:0006268 | DNA unwinding involved in replication | 9 | 7 | 2.48 | 68 | 0.00251 |
| 71 | GO:0043653 | mitochondrial fragmentation involved in ... | 9 | 7 | 2.48 | 147 | 0.00251 |
| 72 | GO:0006573 | valine metabolic process | 9 | 7 | 2.48 | 121 | 0.00251 |
| 73 | GO:0006546 | glycine catabolic process | 9 | 7 | 2.48 | 124 | 0.00251 |
| 74 | GO:0070389 | chaperone cofactor-dependent protein ref... | 9 | 7 | 2.48 | 85 | 0.00251 |
| 75 | GO:0034372 | very-low-density lipoprotein particle re... | 9 | 7 | 2.48 | 52 | 0.00251 |
| 76 | GO:0043648 | dicarboxylic acid metabolic process | 70 | 34 | 19.31 | 33 | 0.00279 |
| 77 | GO:0001889 | liver development | 180 | 67 | 49.65 | 43 | 0.00292 |
| 78 | GO:0006144 | purine nucleobase metabolic process | 18 | 11 | 4.97 | 1293 | 0.00295 |
| 79 | GO:0032367 | intracellular cholesterol transport | 18 | 11 | 4.97 | 139 | 0.00295 |
| 80 | GO:0006721 | terpenoid metabolic process | 67 | 32 | 18.48 | 266 | 0.00295 |
| 81 | GO:0007051 | spindle organization | 92 | 38 | 25.38 | 117 | 0.00305 |
| 82 | GO:0006733 | oxidoreduction coenzyme metabolic proces... | 79 | 37 | 21.79 | 446 | 0.00319 |
| 83 | GO:0007040 | lysosome organization | 36 | 18 | 9.93 | 219 | 0.00351 |
| 84 | GO:0035121 | tail morphogenesis | 16 | 10 | 4.41 | 350 | 0.00365 |
| 85 | GO:0002902 | regulation of B cell apoptotic process | 16 | 10 | 4.41 | 104 | 0.00365 |
| 86 | GO:0017144 | drug metabolic process | 36 | 21 | 9.93 | 78 | 0.00410 |
| 87 | GO:0090200 | positive regulation of release of cytoch... | 26 | 14 | 7.17 | 115 | 0.00414 |
| 88 | GO:0006979 | response to oxidative stress | 366 | 124 | 100.96 | 167 | 0.00434 |
| 89 | GO:0044282 | small molecule catabolic process | 232 | 113 | 64.00 | 543 | 0.00446 |
| 90 | GO:0034377 | plasma lipoprotein particle assembly | 14 | 9 | 3.86 | 70 | 0.00448 |
| 91 | GO:0019395 | fatty acid oxidation | 100 | 43 | 27.58 | 77 | 0.00464 |
| 92 | GO:0051707 | response to other organism | 623 | 201 | 171.85 | 150 | 0.00478 |
| 93 | GO:0051384 | response to glucocorticoid stimulus | 302 | 104 | 83.30 | 190 | 0.00495 |
| 94 | GO:0008033 | tRNA processing | 65 | 28 | 17.93 | 102 | 0.00511 |
| 95 | GO:0000959 | mitochondrial RNA metabolic process | 19 | 11 | 5.24 | 366 | 0.00526 |
| 96 | GO:0046653 | tetrahydrofolate metabolic process | 19 | 11 | 5.24 | 116 | 0.00526 |
| 97 | GO:0001522 | pseudouridine synthesis | 12 | 8 | 3.31 | 22 | 0.00541 |
| 98 | GO:0006370 | 7-methylguanosine mRNA capping | 12 | 8 | 3.31 | 166 | 0.00541 |
| 99 | GO:0031639 | plasminogen activation | 12 | 8 | 3.31 | 86 | 0.00541 |
| 100 | GO:0006591 | ornithine metabolic process | 12 | 8 | 3.31 | 36 | 0.00541 |

La tabella mostra per ogni categoria ontologica genica (GO.ID) il numero di geni in essa contenuti (*Annotated*), il numero di geni significativamente modulati (*Significant*), il numero di geni attesi considerando il numero totale di geni modulati (*Expected*), e valori di probabilità (*elim* e KS). Le categorie ontologiche sono disposte in tabella partendo da quella statisticamente più significativa secondo il valore di probabilità *elim*.

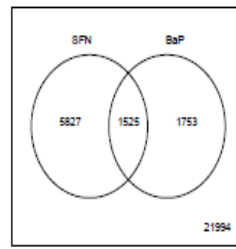
GRAFICO 10.18. DIAGRAMMI DI VENN: SULFORAFANE vs. BENZO(a)PIRENE



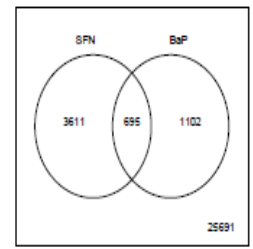
FC = 1 P-value = 0.05



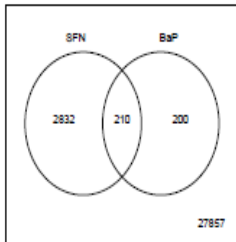
FC = 1 P-value = 0.01



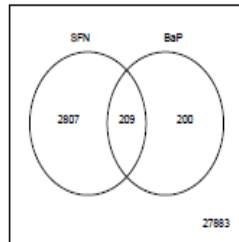
FC = 1 P-value = 0.005



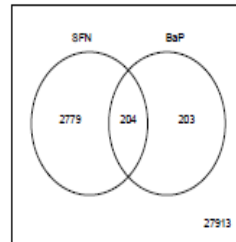
FC = 1 P-value = 0.001



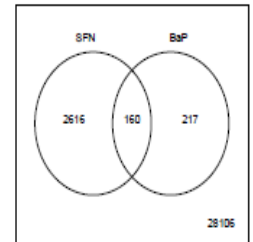
FC = 2 P-value = 0.05



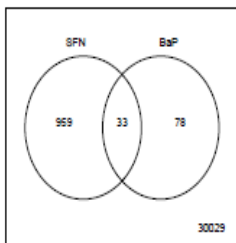
FC = 2 P-value = 0.01



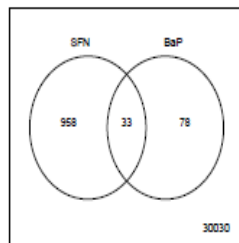
FC = 2 P-value = 0.005



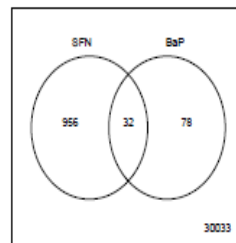
FC = 2 P-value = 0.001



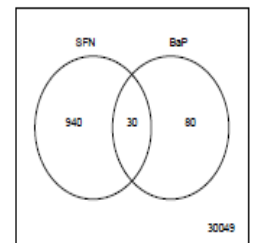
FC = 3 P-value = 0.05



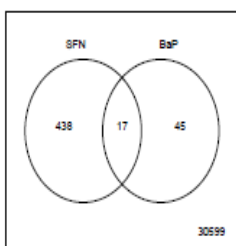
FC = 3 P-value = 0.01



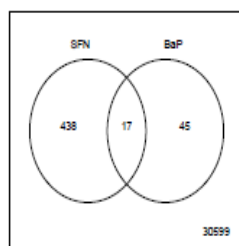
FC = 3 P-value = 0.005



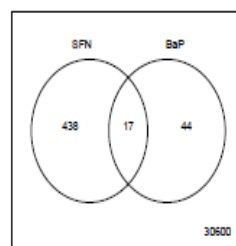
FC = 3 P-value = 0.001



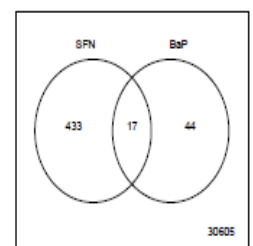
FC = 4 P-value = 0.05



FC = 4 P-value = 0.01

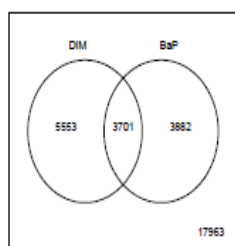


FC = 4 P-value = 0.005

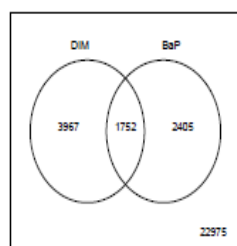


FC = 4 P-value = 0.001

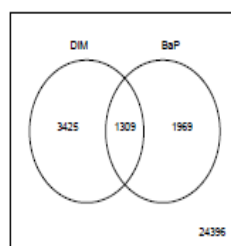
GRAFICO 10.19. DIAGRAMMI DI VENN: 3,3'-DIINDOLIMETANO vs. BENZO(a)PIRENE



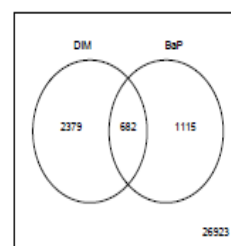
FC = 1 P-value = 0.05



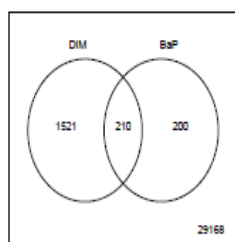
FC = 1 P-value = 0.01



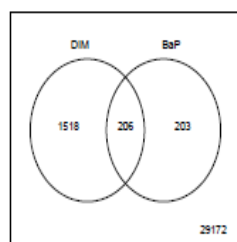
FC = 1 P-value = 0.005



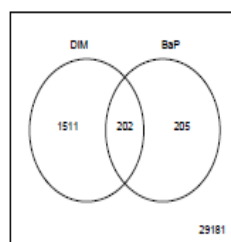
FC = 1 P-value = 0.001



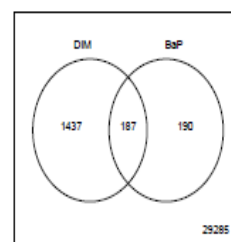
FC = 2 P-value = 0.05



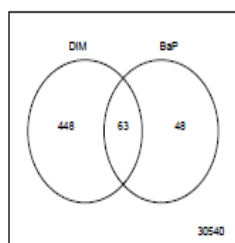
FC = 2 P-value = 0.01



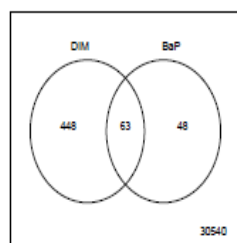
FC = 2 P-value = 0.005



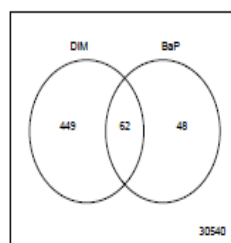
FC = 2 P-value = 0.001



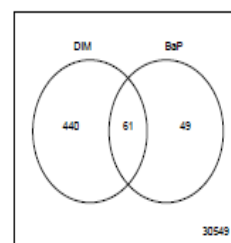
FC = 3 P-value = 0.05



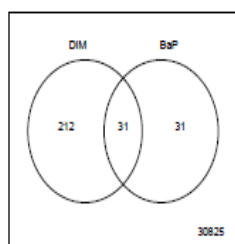
FC = 3 P-value = 0.01



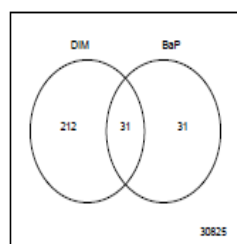
FC = 3 P-value = 0.005



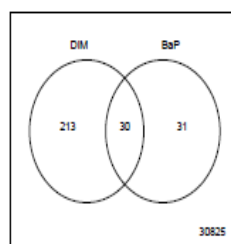
FC = 3 P-value = 0.001



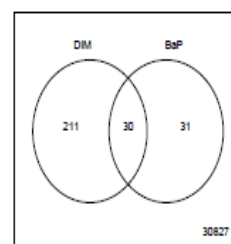
FC = 4 P-value = 0.05



FC = 4 P-value = 0.01

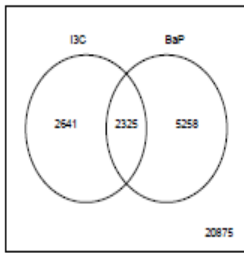


FC = 4 P-value = 0.005

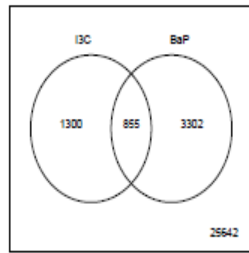


FC = 4 P-value = 0.001

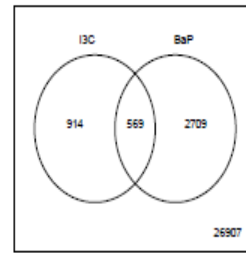
GRAFICO 10.20. DIAGRAMMI DI VENN: INDOLO-3-CARBINOLO vs. BENZO(a)PIRENE



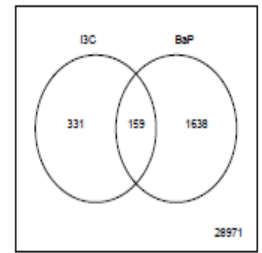
FC = 1 P-value = 0.05



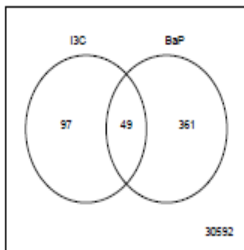
FC = 1 P-value = 0.01



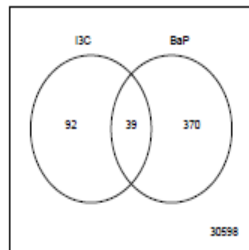
FC = 1 P-value = 0.005



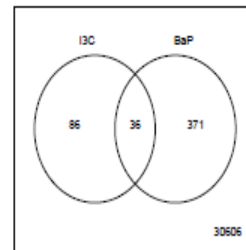
FC = 1 P-value = 0.001



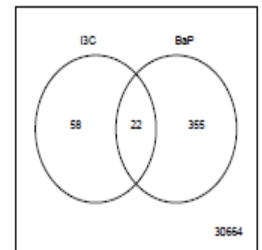
FC = 2 P-value = 0.05



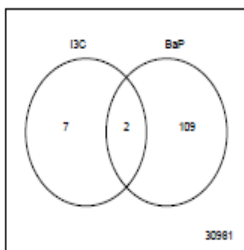
FC = 2 P-value = 0.01



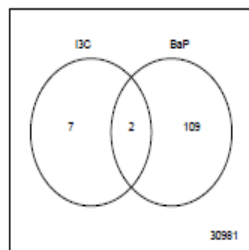
FC = 2 P-value = 0.005



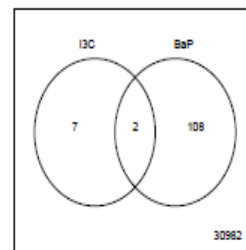
FC = 2 P-value = 0.001



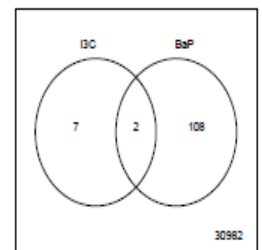
FC = 3 P-value = 0.05



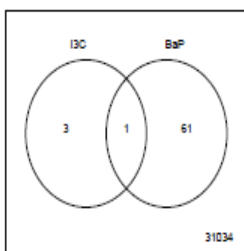
FC = 3 P-value = 0.01



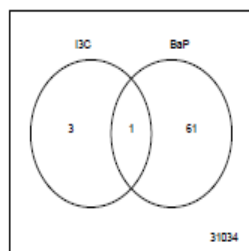
FC = 3 P-value = 0.005



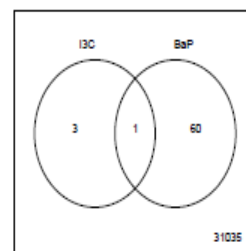
FC = 3 P-value = 0.001



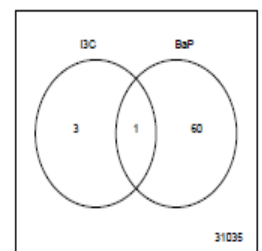
FC = 4 P-value = 0.05



FC = 4 P-value = 0.01

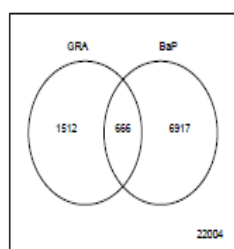


FC = 4 P-value = 0.005

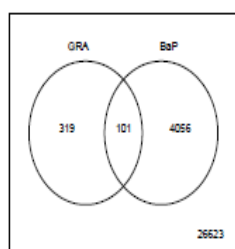


FC = 4 P-value = 0.001

GRAFICO 10.21. DIAGRAMMI DI VENN: GLUCORAFANINA vs. BENZO(a)PIRENE



FC = 1 P-value = 0.05



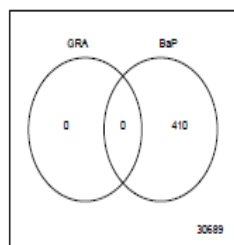
FC = 1 P-value = 0.01



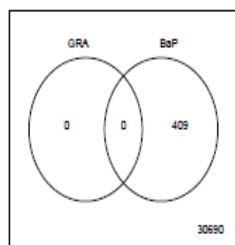
FC = 1 P-value = 0.005



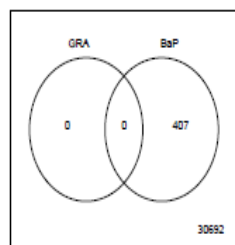
FC = 1 P-value = 0.001



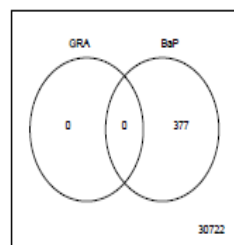
FC = 2 P-value = 0.05



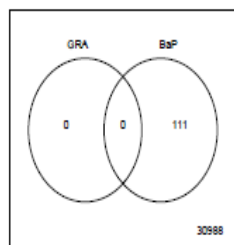
FC = 2 P-value = 0.01



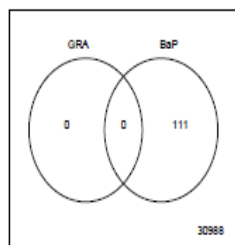
FC = 2 P-value = 0.005



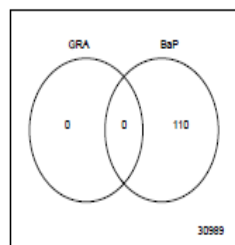
FC = 2 P-value = 0.001



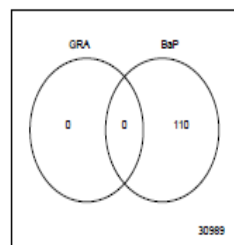
FC = 3 P-value = 0.05



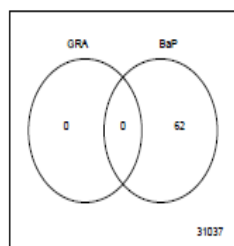
FC = 3 P-value = 0.01



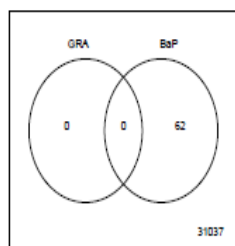
FC = 3 P-value = 0.005



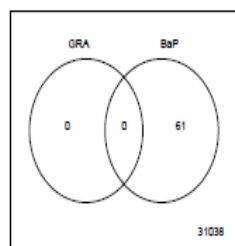
FC = 3 P-value = 0.001



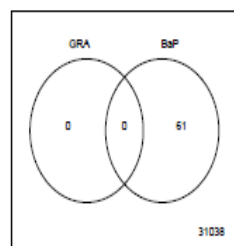
FC = 4 P-value = 0.05



FC = 4 P-value = 0.01

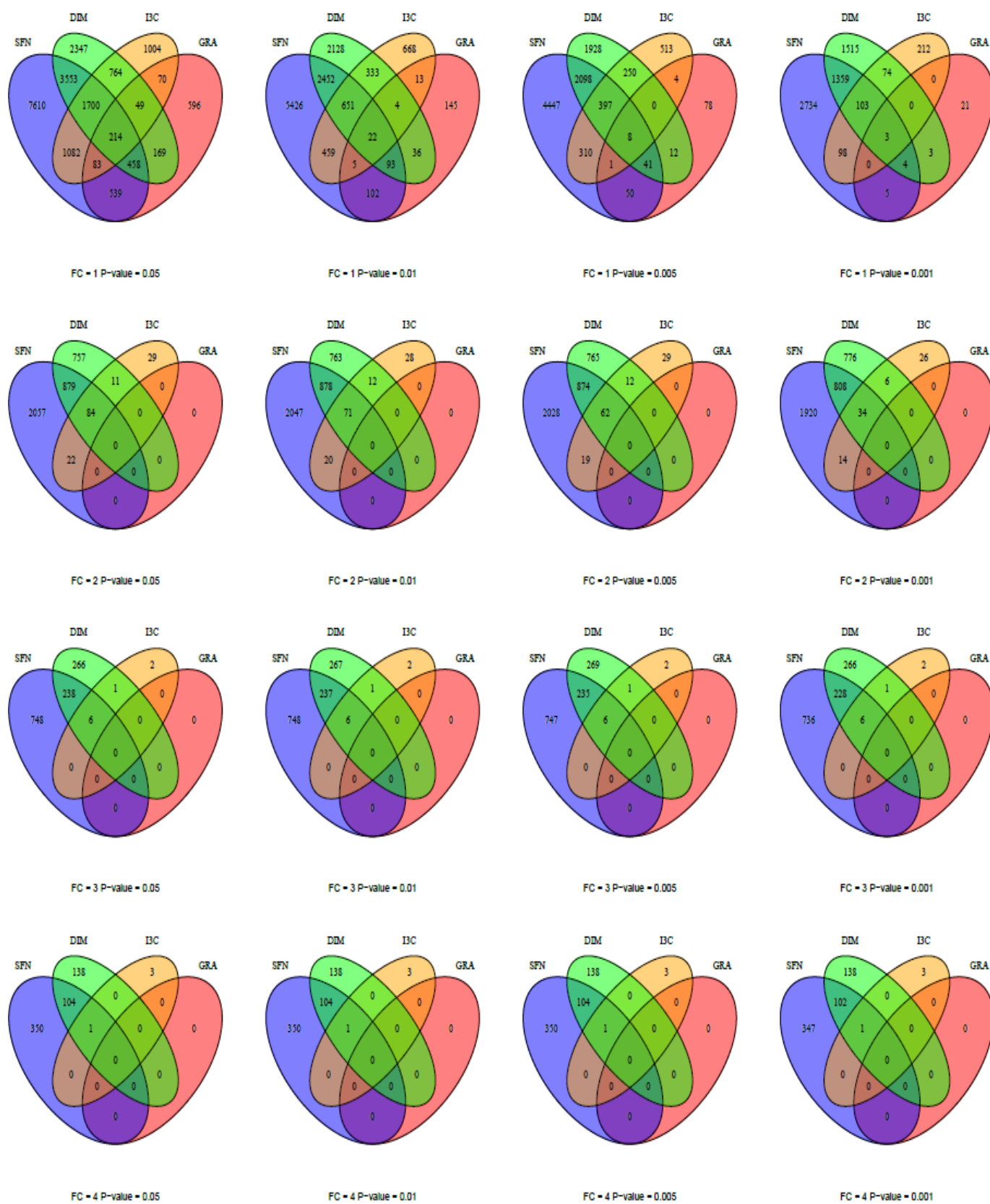


FC = 4 P-value = 0.005



FC = 4 P-value = 0.001

GRAFICO 10.22. DIAGRAMMI DI VENN: SULFORAFANE, 3,3'-DIINDOLIMETANO, INDOLO-3-CARBINOLO, E GLUCORAFANINA



Nei diagrammi (10.18-10.22) sono riportati il numero di geni influenzati per ogni condizione, a seconda della restrizione applicata. Nelle zone di sovrapposizione è riportato il numero di geni modulati in comune dai composti considerati. I numeri all'interno dei quadrati, in basso a destra, indicano i geni analizzati che non hanno subito modificazioni significative. Le colonne sono suddivise in base alla restrizione ($p=1$, $p=0.05$, $p=0.005$, $p=0.001$), le righe in base al grado di modulazione genica, espressa in *fold change* (FC). La significatività è stata determinata tramite il *moderated t-test R-package* (Limma).

CAPITOLO 11

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il riconoscimento della dieta, come fattore cruciale nella prevenzione di numerose condizioni patologiche, ha stimolato la ricerca in campo nutrizionale per sviluppare strategie alimentari per promuovere e mantenere la salute dell'uomo. Sono stati identificati una grande varietà di componenti bioattivi in frutta e verdura, e molti di questi sono stati stimati come potenziali alimenti nutraceutici e funzionali (MacDonald *et al.* 2009).

Secondo la teoria chemiopreventiva classica l'assunzione di composti e molecole naturali in grado di limitare l'attivazione di sostanze precancerogene, e di aumentare la capacità detossificante nei confronti di sostanze tossiche costituirebbe una strategia preventiva determinante in grado di contrastare l'insorgenza di tumori (Talalay 1989, Zhang 2012).

D'altro canto però, un elevato consumo di vegetali o *phytochemicals*, in grado di modulare questi sistemi cellulari, come per esempio indicato da alcuni programmi alimentari che prevedono un regime monodietetico o l'assunzione di elevate dosi di integratori, possono portare ad effetti indesiderati, soprattutto per una perturbazione del sistema metabolizzante, per un aumento dello stress ossidativo e di eventi genotossici (Assayed *et al.* 2009, Sapone *et al.* 2012).

Negli ultimi anni, numerosi studi hanno messo in evidenza l'effetto chemiopreventivo di composti fitochimici derivati da vegetali appartenenti alla famiglia delle Brassicaceae. Le loro proprietà benefiche si esplicherebbero principalmente tramite l'induzione degli enzimi detossificanti di fase II, l'inibizione della superfamiglia del citocromo P450, l'azione antiossidante ed antinfiammatoria, la regolazione del ciclo cellulare e l'induzione di apoptosi in cellule tumorali (Cheung *et al.* 2010).

Gli ITC, prodotti di degradazione dei GLS, particolarmente abbondanti nelle Brassicaceae, sono considerati i composti bioattivi responsabili dei numerosi effetti biologici attribuiti a questi vegetali.

In seguito ad ingestione di Brassicaceae, l'idrolisi dei GLS a ITC può avvenire da parte dell'enzima MYR, presente nelle cellule vegetali, oppure da parte dell'isoforma presente nella flora batterica a livello intestinale (Hayes *et al.* 2008). Diversi fattori chimici, fisici e biologici possono interferire con questa reazione di idrolisi, quindi risulta difficile prevedere con certezza la natura e la quantità dei prodotti bioattivi finali e la loro biodisponibilità. Gli effetti salutari delle Brassicaceae vengono attribuiti generalmente agli ITC, e la letteratura a riguardo è molto ampia; ciononostante da alcuni dati recenti sta emergendo evidenza di una possibile attività biologica diretta e di un assorbimento intestinale dei GLS intatti. Dai numerosi lavori in cui è stato studiato l'effetto (benefico e/o tossico) di alcuni vegetali *in toto*, di estratti o di molecole pure (soprattutto SFN e il suo precursore GRA), emergono risultati non sempre concordanti, dai quali non è possibile identificare con chiarezza la classe di molecole (GLS o ITC) principalmente responsabili degli effetti che si osservano.

Lo scopo iniziale del lavoro è stato quello di identificare se gli effetti delle Brassicaceae, in termini di attività sugli enzimi del metabolismo degli xenobiotici e antiossidanti, siano dovuti principalmente ai GLS, ai loro prodotti di idrolisi, o ad una loro azione sinergica nel contesto di altre molecole presenti normalmente nel vegetale *in toto*. Per raggiungere tale obiettivo è stato eseguito un trattamento *in vivo*, con TBCSE, caratterizzato da un alto contenuto di GLS, assenza di ITC e di MYR, che in alcuni casi è stato "bioattivato" tramite l'aggiunta di MYR esogena. Come è stato dimostrato, questo stratagemma ha permesso di convertire con alta efficienza tutti i GLS presenti nell'estratto ad ITC.

I dati ottenuti in questa parte, hanno mostrato nel complesso un *trend* di moderata inattivazione degli enzimi di fase I, insieme ad un'induzione dell'attività degli enzimi di fase II, e antiossidanti, in seguito al trattamento con TBCSE. Dai risultati osservati non emergono differenze significative

per quanto riguarda la modulazione delle isoforme di CYP450 e degli enzimi antiossidanti, tra i vari gruppi di trattamento (TBCSE per os MYR± e ip MYR±), e quindi tra le somministrazioni dell'estratto contenente GLS o ITC nel modulare gli enzimi di fase I. Al contrario, nello studio degli enzimi di fase II, sono state osservate induzioni significative in tutti i gruppi di trattamento, tranne che per il gruppo trattato per ip senza aggiunta di MYR, in cui gli animali sono stati esposti all'estratto contenente solo GLS, in quanto non c'è stata aggiunta di MYR esogena o passaggio intestinale, che possa aver provocato una conversione dei GLS a ITC. Il trattamento è stato in grado di indurre l'attività della GST e della UDP-GT, solamente nei casi in cui avveniva un'idrolisi dei GLS, da parte della MYR intestinale o esogena, evidenziando in questo modo il fondamentale ruolo degli ITC, rispetto ai composti parentali, nel modulare gli enzimi detossificanti. Il ruolo biologico degli ITC, in particolare del SFN, è ben documentato in letteratura, ma l'attività dei loro precursori GLS è ancora incerta. Diversamente dai risultati di questo studio, è stato recentemente osservata un'azione diretta di singoli GLS intatti nel modulare le attività di alcuni enzimi di fase II in un sistema *in vitro*, (Abdull Razis *et al.* 2011b), ma questa discrepanza potrebbe essere dovuta a differenti condizioni sperimentali.

L'aumento osservato dell'attività del macchinario antiossidante considerato (CAT, NQO1 e GSSG-RED), anche se accompagnato da una leggera diminuzione dell'attività di GSH-px, nel gruppo trattato per via ip con TBCSE MYR- (assenza di trasformazione dei GLS ad ITC), potrebbe essere quindi a supporto di un nuovo importante ruolo dei GLS non idrolizzati nell'influenzare positivamente questi enzimi antiossidanti. In modo simile, anche in alcuni esperimenti condotti *in vitro*, l'attività della NQO1 è stata indotta dai GLS intatti, come la GRA e GRE (Abdull Razis *et al.* 2010).

Complessivamente, l'inattivazione osservata del sistema monoossigenasico CYP450 dipendente, accompagnata da un aumento dell'attività degli enzimi antiossidanti e di fase II, dovuta alla somministrazione di TBCSE, sembra essere in accordo con la teoria chemiopreventiva classica (Talalay 2000,

Suganuma *et al.* 2011). Se l'aggiunta di una fonte esogena di MYR all'estratto rappresenti un vantaggio o meno, rimane ancora da essere determinato con precisione. Ciononostante molti studi sostengono che l'attività della MYR sia necessaria per raggiungere una biodisponibilità massima di ITC, e quindi per migliorare potenzialmente l'impatto sulla salute degli integratori a base di Brassicaceae (Cramer *et al.* 2011, Clarke *et al.* 2011). I risultati di questo lavoro, con particolare riferimento agli enzimi di fase II, supportano questa idea, ma più probabilmente, altre classi di molecole, piuttosto che gli ITC singolarmente, hanno contribuito complessivamente agli effetti registrati. A tale proposito, non è senza significato il fatto che alcuni lavori recenti, hanno mostrato che un "miscuglio" di *phytochemicals* derivante da vegetali o frutta, conferiva una maggior protezione rispetto all'assunzione di singole classi di molecole, accompagnato inoltre da un minor rischio di conseguenti eventi tossici (Robbins *et al.* 2011). Inattese modulazioni significative, come l'inattivazione di alcune isoforme di CYP450 (ECOD, EROD, MROD, e PROD), e l'induzione degli enzimi antiossidanti CAT, NQO1, e GSSG-RED, sono state infatti osservate in seguito al trattamento con TBCSE per ip senza predigestione con MYR, e quindi senza formazione di ITC.

Queste originali osservazioni ottenute nel modello animale, sono del tutto compatibili con il concetto emergente che altri *phytochemicals*, diversi dagli ITC, presenti nelle Brassicaceae, come i GLS intatti per esempio, potrebbero svolgere un importante ruolo biologico. L'effetto additivo e le interazioni sinergiche tra una moltitudine di diversi composti, sarebbero evidentemente più efficaci nel contrastare i numerosi meccanismi coinvolti nel processo multifasico di cancerogenesi (Steinkellner *et al.* 2001).

Complessivamente, gli effetti delle Brassicaceae, sembrano essere i risultati delle attività sinergiche di GLS e ITC, insieme alle altre migliaia di molecole della matrice vegetale, piuttosto che derivare da una singola classe di molecole. Un interesse scientifico per gli estratti, che riproducono in modo più completo la complessità dell'assunzione di un vegetale *in toto*, sta infatti emergendo (Vang *et al.* 2001).

Diversi studi in letteratura, riportano inoltre effetti benefici associati al consumo di Brassicaceae nel contrastare gli effetti deleteri di una dieta iperlipidica, dovuti principalmente alle loro proprietà ipolipemizzanti, dimagranti e antiossidanti. È noto, infatti, che una dieta con un elevato contenuto di grassi aumenta la produzione di ROS, i livelli di lipidi sierici e diminuisce le difese antiossidanti (An *et al.* 2010, Waqar *et al.* 2010).

Lo scopo principale di questa parte della tesi è stato quello di esplorare il ruolo preventivo della somministrazione orale di TBCSE nel ratto, verso le alterazioni indotte da una dieta iperlipidica. È stata investigata principalmente la proprietà di modulare il macchinario antiossidante, gli enzimi di fase II, i valori lipidici ematici, come TRG, TC e NEFA, e la capacità di regolare il peso corporeo. Anche in questo caso, l'estratto è stato in alcuni casi "predigerito" con MYR esogena, prima della somministrazione, col fine di migliorare la biodisponibilità degli ITC.

L'alimentazione ricca di grassi ha indotto una condizione di iperlipidemia, che è stata confermata da un profilo lipidico sierico superiore agli animali di controllo. I risultati ottenuti hanno rivelato che la supplementazione con TBCSE è stata in grado di diminuire i livelli sierici di lipidi aumentati dalla dieta HFD, in particolare nei due dosaggi, minimo e massimo, senza MYR. Inoltre l'estratto è risultato in grado di ridurre il peso corporeo, soprattutto nei gruppi trattati con il dosaggio minore. Anche se è stata riscontrata una modesta riduzione dell'assunzione di cibo in alcuni gruppi sperimentali trattati con TBCSE, questo non sembra essere il fattore principale ad aver determinato la diminuzione del peso corporeo e dei parametri lipidici osservati, piuttosto dovuta alle proprietà biologiche del trattamento.

Nel gruppo HFD, le attività degli enzimi epatici antiossidanti (CAT, NQO1, GSSG-red e SOD) hanno subito un significativo decremento, in accordo con la letteratura, che riporta una depressione del sistema antiossidante cellulare, in seguito ad un'alimentazione ricca di grassi (Du *et al.* 2010, Sankhari *et al.* 2012). Queste diminuzioni delle attività dei sistemi difensivi potrebbero essere plausibilmente attribuite ad un loro "estremo impiego" nel contrastare

l'eccesso di stress ossidativo associato alla condizione di iperlipidemia. Inoltre le specie reattive, in grado di danneggiare le membrane e gli enzimi cellulari, potrebbero ulteriormente aver aggravato la condizione di stress (Yazdanparast *et al.* 2008).

Al contrario, l'attività della GSH-px non è stata influenzata significativamente da HFD rispetto al gruppo RD, in modo simile ad un altro studio in cui non sono state riscontrate differenze nei livelli di espressione epatica di GSH-px tra gruppi di topi alimentati con HFD e i controlli. Questa discrepanza, rispetto agli altri enzimi antiossidanti studiati, potrebbe quindi essere dovuta a differenti meccanismi molecolari di regolazione in risposta ad un eccesso di lipidi (Matsuzawa-Nagata *et al.* 2008).

Nei ratti alimentati con HFD, la somministrazione orale di TBCSE, sia in presenza che in assenza di MYR esogena, ha provocato un recupero dell'attività specifica relativa agli enzimi epatici analizzati, riportandola verso livelli normali, e in alcuni casi sopra di essa. Gli enzimi più responsivi al trattamento con l'estratto sono stati: CAT e GSH-px, aumentate dalla dose minore con MYR, così come GSSG-red, SOD e NQO1 indotte dal dosaggio maggiore in assenza di MYR.

Questo effetto di recupero è probabilmente dovuto all'alto contenuto di flavonoidi, fenoli e organosolfuri, presenti nell'estratto, che possono sia agire direttamente da *scavengers*, che stimolare indirettamente le difese enzimatiche antiossidanti attraverso l'attivazione del pathway Nrf2-*antioxidant response element* (ARE) dipendente (Nair *et al.* 2007, Abdel-Wahhab *et al.* 2003).

L'attività degli enzimi di fase II, GST e UDPGT, analogamente è stata significativamente soppressa nel gruppo HFD, mentre TBCSE è risultato efficace nel contrastare questo decremento, nella maggior parte dei gruppi sperimentali, seppure senza una chiara distinzione tra i trattamenti con e senza predigestione da parte della MYR esogena. Le principali modulazioni registrate sono state per l'UDPGT, da parte della dose maggiore con MYR, e per la GST, da parte della dose maggiore senza MYR.

Gli enzimi detossificanti di fase II sono, in parte, proteine di membrana, pertanto eventuali modifiche nella composizione in acidi grassi delle membrane fosfolipidiche potrebbero influenzare la fluidità, e potenzialmente alterarne l'attività degli enzimi associati. Gli acidi grassi assunti con gli alimenti potrebbero quindi essere causa di una deregolazione dei sistemi detossificanti e conseguentemente, di un'alterata risposta farmacologica o di fenomeni di tossicità in seguito all'assunzione di farmaci (Wilkinson 2005).

Oltre agli effetti precedentemente citati, le proprietà benefiche dell'assunzione di questo estratto, potrebbero spiegarsi grazie alla capacità di inibire l'assorbimento intestinale di grassi, di stimolare il catabolismo lipidico, e di modulare geni coinvolti nell'omeostasi lipidica del fegato (Sankhari *et al.* 2012). È inoltre ragionevole supporre che questi meccanismi siano in parte responsabili della diminuzione dei parametri lipidici e del peso corporeo, osservata in seguito alla somministrazione dell'estratto.

Anche in questo caso, non risulta ancora chiaro a quali classi di molecole siano ascrivibili gli effetti preventivi osservati. La conversione totale dei GLS a ITC attraverso l'aggiunta di MYR esogena, dimostrata sperimentalmente, non sembra conferire ulteriori vantaggi, rispetto all'estratto non "bioattivato". Infatti, non sono state registrate sostanziali differenze tra l'estratto contenente un miscuglio di GLS e ITC (questi ultimi prodotti dall'azione mirosinasi intestinale), o solamente ITC (dovuti all'incubazione con MYR esogena). Nell'insieme, l'efficacia di TBCSE senza "bioattivazione", sembra essere del tutto simile a quella con idrolisi preliminare dei GLS, e in alcuni casi, perfino superiore, come per esempio per le attività della GST, NQO1, e SOD, e per il profilo lipidico ematico. Questo suggerisce quindi, che probabilmente, un effetto additivo e/o sinergico tra GLS e ITC possa conferire vantaggi ulteriori, contro le deleterie alterazioni indotte da una dieta ricca di grassi. Risulta plausibile inoltre, che la complessa miscela di sostanze fitochimiche, derivanti da un vegetale intero, fornisca effetti benefici maggiori rispetto a singole molecole

isolate. A tale riguardo è stata recentemente descritta, una maggiore attività ipocolesterolemica di un estratto di broccolo, rispetto a quella di singole molecole (es. SFN), evidenziando così l'importanza dell'effetto della matrice vegetale sulla bioattività delle singole molecole (Rodriguez-Cantù *et al.* 2011). La somministrazione di un estratto vegetale come supplemento alla dieta, che meglio rappresenta la complessità di un vegetale *in toto*, sembrerebbe quindi una strategia alimentare preventiva più opportuna, rispetto all'utilizzo di singole molecole purificate di origine vegetale.

In conclusione, dai risultati ottenuti in questi due studi, TBCSE emerge essere un promettente prodotto nutraceutico con potenziali effetti chemiopreventivi, e da impiegare come strategia alimentare per contrastare e prevenire le alterazioni correlate ad una dieta ricca di grassi e le numerose condizioni patologiche ad essa legate.

Sebbene i risultati ottenuti in questo lavoro siano promettenti, una valutazione complessiva delle attività biologiche di TBCSE necessita di ulteriori approfondimenti per comprendere le sue proprietà e soprattutto gli aspetti riguardanti il rischio tossicologico derivante da una “manipolazione” degli enzimi del metabolismo degli xenobiotici (Paolini *et al.* 2003), al fine di determinare e valutare il rapporto rischio/beneficio per un'eventuale assunzione su larga scala, come agente nutraceutico per migliorare la salute umana. Certamente, un *trial* clinico in tal senso potrebbe rendere ragione dei risultati ottenuti.

La scoperta delle proprietà benefiche delle Brassicaceae, ha portato allo sviluppo di strategie alimentari preventive per la salute, che prevedono un regolare consumo di elevati dosaggi di *phytochemicals* isolati da questi vegetali, principalmente tramite integratori alimentari. Il rationale di tali strategie sarebbe principalmente basato sull'analogia tra effetto benefico di un vegetale nella sua interezza (probabilmente dovuto a decine di migliaia di molecole), e quello di una singola molecola rappresentativa dell'alimento vegetale in questione (Paolini *et al.* 2003). Questo ha stimolato

conseguentemente, un'ampia ed incontrollata diffusione sul mercato di prodotti per la salute umana, contenenti pericolose quantità di molecole biologicamente attive, e che non sono state sottoposte ad uno studio del loro profilo tossicologico. Non può essere, infatti, escluso in modo assoluto un rischio per la salute associato al consumo di elevati dosaggi di GLS o ITC, considerando soprattutto alcune osservazioni, seppur ancora limitate, sui loro potenziali effetti nocivi (Holst *et al.* 2004, Sapone *et al.* 2012).

Queste molecole, ad alti dosaggi, sono in realtà in grado di perturbare fortemente il sistema enzimatico responsabile del metabolismo e della detossificazione di farmaci e xenobiotici, con numerose conseguenze negative. Diversi studi hanno riportato effetti tossici in seguito all'esposizione ad elevati livelli di *phytochemicals* derivati dalle Brassicaceae, come l'aumento di metaboliti tossici e di specie radicaliche altamente reattive, causate principalmente da un incremento dell'attività bioattivante di questo sistema enzimatico, alterazioni delle funzioni mitocondriali, eventi apoptotici, arresto del ciclo cellulare, ed effetti genotossici (Paolini *et al.* 2004, Fimognari *et al.* 2011). Inoltre, poiché il fegato è il principale organo di primo passaggio, con un ruolo fondamentale nella bioattivazione e nella detossificazione di composti chimici come xenobiotici, farmaci e cancerogeni, dovuto all'alto contenuto di enzimi metabolici (principalmente citocromo P450), esso può essere considerato uno dei principali organi bersaglio della tossicità legata a questo tipo di molecole. Alcuni lavori hanno descritto evidenti segni di epatotossicità in modelli animali, come alterazioni istopatologiche, ipertrofia epatica, modificazioni dei valori delle transaminasi, in seguito al consumo di ITC e composti indolici derivati dalle Brassicaceae (Crowell *et al.* 2006, Oganessian *et al.* 1999). Inoltre, ogni modulatore del sistema monoossigenasico citocromo P450-dipendente può essere potenzialmente responsabile di risposte avverse e di interazioni farmacologiche a livello epatico.

Anche se non è ancora del tutto chiaro quale concentrazione possa essere raggiunta nei tessuti umani in seguito al consumo di questi prodotti, alcuni

studi *in vivo* hanno osservato che possono essere raggiunte concentrazioni micro- e milli-molari nel plasma e negli epatociti, rispettivamente, che risultano in parte sovrapponibili con quelle che hanno mostrato effetti (geno)tossici negli esperimenti *in vitro* ed *in vivo* (Zhang 2004, Fimognari *et al.* 2011). In aggiunta, questi *phytochemicals* essendo tutti agonisti del recettore AhR, potrebbero svolgere potenzialmente un'azione tossica paragonabile a quella provocata da composti diossina-simili, tra cui il BaP, i cui effetti deleteri sono mediati dall'attivazione del *pathway* AhR dipendente (Waard *et al.* 2008).

Lo scopo di questa parte della tesi, svolto presso il *The Leibniz Research Centre for Working Environment and Human Factors* (IfADo) a Dortmund in Germania, è stato quello di studiare il profilo di espressione genica, tramite *microarrays*, la citotossicità e la generazione di stress ossidativo, in epatociti primari di ratto, esposti a GRA, SFN, DIM e I3C. Inoltre, il profilo di espressione genica ottenuto è stato confrontato con quello ottenuto dall'esposizione al BaP, con lo scopo di identificare possibili meccanismi comuni alla base della loro azione tossica.

Dai risultati ottenuti, si può notare un effetto citotossico sugli epatociti da parte di SFN, DIM e I3C a concentrazioni del tutto paragonabili a quelle che potrebbero essere raggiunte nel plasma o a livello epatico, in seguito alla somministrazione di queste molecole a scopo terapeutico o preventivo. L'esposizione con GRA e BaP non ha provocato riduzioni significative della vitalità cellulare in accordo con i dati in letteratura relativi a diversi sistemi cellulari, suggerendo meccanismi di azione differenti (Woo *et al.* 2008, Kiefer *et al.* 1988). Per quanto riguarda i dati ottenuti dal saggio dei TBARS, si può notare come ci sia stato un aumento di stress ossidativo, registrato tramite l'aumento di MDA, da parte delle molecole utilizzate rispetto ai controlli, tranne che da parte di I3C. L'aumento di specie radicaliche, potrebbe essere spiegato dall'effetto proossidante di questi composti, principalmente dovuto alla deplezione dei livelli intracellulari di GSH, e della generazione di ROS tramite diversi meccanismi: lo stesso gruppo funzionale degli ITC (-N=C=S) può subire reazioni di

ossidazione, per esempio reagendo con il perossido di idrogeno portando alla formazione di superossido (Murata *et al.* 2000); alterazioni delle funzioni e danni mitocondriali, che portano ad una perdita del potenziale *trans* membrana e al disaccoppiamento dalla catena di trasporto degli elettroni con risultante formazione di ROS; la perturbazione del sistema monoossigenasico citocromo P450-dipendente, come riportato in diversi studi, è un'importante fonte di stress ossidativo (Paolini *et al.* 2004b). L'assenza di MDA rilevata in seguito all'esposizione a I3C, potrebbe essere spiegata considerando che durante il tempo di esposizione (24 ore) potrebbe esserci stato un recupero da parte dei sistemi cellulari antiossidanti. Inoltre, da un punto di vista strutturale bisogna considerare che l'I3C ha una minore densità di elettroni (4 doppi legami) rispetto al suo prodotto di condensazione DIM (8 doppi legami), e ciò lo renderebbe meno suscettibile verso l'ossidazione, e alla coniugazione con composti tiolici, come il GSH, riducendo così la generazione di stress ossidativo, rispetto a DIM (Ernst *et al.* 2011). Questo risultato è inoltre paragonabile a quello riportato da un altro studio, in cui l'esposizione di cellule stellate epatiche all'I3C non provocava aumento di ROS (Ping *et al.* 2011).

I dati del profilo di espressione genica, ottenuti tramite *microarrays*, mostrano come il SFN e il DIM siano potenti modulatori dell'espressione genica, ed abbiano provocato alterazioni di maggior entità e più significative rispetto ad I3C e GRA. Dalla *heatmap*, basata sui 100 geni più significativi, si possono notare punti con simile *pattern* di espressione genica tra SFN, DIM e BaP, e in minor modo da parte di I3C. Il SFN ha provocato inoltre una maggior induzione dell'espressione genica, seguita da DIM e BaP, rispetto a I3C e GRA, in cui prevale invece una deregolazione dell'espressione genica, e possono essere individuate solo zone limitate di induzione.

Tra le classi funzionali maggiormente alterate se ne possono notare alcune correlate a possibili meccanismi tossici dei *phytochemicals* studiati, come per esempio quelle riguardanti le proteine del complesso della catena respiratoria mitocondriale e gli enzimi coinvolti nel metabolismo

dell'ubichinone, che potrebbero indicare una possibile alterazione delle funzioni di questi organelli e dello stato ossidoreduattivo cellulare, come possibile conseguenza dell'aumento dello stress ossidativo osservato; geni per enzimi coinvolti nella riparazione dei danni al DNA, plausibilmente per sopperire ad eventi genotossici; geni per la *clearance* di cellule apoptotiche, a sottolineare un possibile aumento di eventi apoptotici; e geni per enzimi coinvolti nel metabolismo degli xenobiotici e farmaci, ad indicare un'influenza significativa su questo sistema metabolico. Tra i geni che sono stati maggiormente influenzati dall'esposizione con SFN, e che sono risultati comunemente alterati dal BaP, si trovano la diidropirimidina deidrogenasi, che codifica per un enzima coinvolto nel catabolismo di basi pirimidiniche, la cui modulazione potrebbe riflettere un danno agli acidi nucleici; geni per enzimi del metabolismo degli xenobiotici come sulfotransferasi 1a1, CYP1a1, CYP1a2, in grado di bioattivare gli idrocarburi policiclici aromatici in molecole altamente reattive verso componenti cellulari, rappresentando in questo modo un potenziale meccanismo epigenetico di cancerogenesi. Ulteriori geni, che hanno subito profonde alterazioni da parte del SFN sono la metalloproteasi di matrice, coinvolta nella degradazione della matrice extracellulare ed associata con l'iniziazione dei tumori e con la capacità di metastatizzare (Choi *et al.* 2011), l'apoptin-associating protein 1, coinvolta in eventi apoptotici; alcuni membri della famiglia delle aldochetoreduattasi coinvolte nella detossificazione di aldeidi reattive e che svolgono un ruolo determinante nel processo di cancerogenesi (Wang *et al.* 2009).

L'esposizione con DIM ha indotto alterazioni dell'espressione genica soprattutto nelle classi funzionali correlate al metabolismo degli xenobiotici, al danno mitocondriale, alla risposta e alla regolazione dello stress ossidativo cellulare, sottolineando una rilevante produzione di specie radicaliche da parte di DIM, come mostrato dagli elevati valori di MDA registrati. Considerando le 100 classi funzionali maggiormente influenzate, il 25 % di esse sono risultate in comune con quelle alterate dal BaP, tra cui principalmente quelle relative a processi metabolici del GSH, allo sviluppo

epatico, al metabolismo di farmaci e degli xenobiotici, e alla risposta verso lo stress ossidativo. In modo simile al SFN, DIM ha provocato una forte alterazione di alcune isoforme di CYP450 come CYP1a1, della metalloproteasi di matrice, e dei membri della famiglia delle aldochetoreduccasi. La forte induzione di NQ01, più di 7 volte, potrebbe essere legata ad un meccanismo di difesa contro l'aumento dello stress ossidativo generato.

L'esposizione all'I3C ha provocato un numero elevato di geni alterati, ma con un modesto grado di modulazione, rispetto a SFN e DIM, che avevano invece provocato modulazioni dell'espressione genica anche fino a 10 volte. Tra questi comunque, le classi funzionali maggiormente influenzate hanno riguardato quelle relative al controllo del ciclo cellulare, al metabolismo dei farmaci, e ai processi ossidoreduccivi. Anche il glucosinolato GRA, a cui spesso non vengono attribuite proprietà biologiche in letteratura, ha mostrato di essere in grado di modulare l'espressione genica di un alto numero di geni, seppur in maniera moderata, oltre che a provocare un aumento dello stress ossidativo, come era già stato osservato in precedenti studi (Paolini *et al.* 2004b, Perocco *et al.* 2006).

Degno di nota è anche l'osservazione, tramite i diagrammi di Venn, di un elevato numero di geni in comune influenzati tra i composti in studio, e BaP, a sottolineare possibili similitudini nei meccanismi di azione e di essere in grado, almeno potenzialmente, di provocare simili effetti.

Questi dati, nell'insieme, mostrano che le molecole in studio possono determinare effetti citotossici ed indurre un aumento dello stress ossidativo, a concentrazioni che possono essere facilmente raggiunte *in vivo* all'interno degli epatociti o nel plasma in seguito al consumo di dosaggi sovralimentari. Inoltre l'analisi del profilo di espressione genica, va a confermare alcuni meccanismi di tossicità, in parte già noti, come l'alterazione dello stato ossidoreduccivo cellulare, dei mitocondri, effetti citotossici e genotossici, induzione dell'apoptosi, ma anche meccanismi non ancora ben approfonditi in letteratura, come processi (co)cancerogeni tramite i quali aumenterebbe la capacità di bioattivazione dei precancerogeni e di invasione da parte dei

tumori, che sono in parte sovrapponibili a quelli indotti da un noto cancerogeno come il BaP. Inoltre, l'induzione di numerosi geni codificanti per le *heat shock proteins*, per proteine del proteasoma e coinvolte nel processo di ubiquitinazione, indicherebbe un danno generale alle proteine, causato presumibilmente da ROS e da molecole elettrofile (Kwak *et al.* 2003).

Certamente, questi dati ottenuti *in vitro*, non sono direttamente estrapolabili ad una situazione *in vivo*; ciononostante fanno riflettere sulle pericolose potenzialità di queste molecole, che vengono assunte e somministrate in elevate quantità nella popolazione, senza una preventiva valutazione completa del loro potenziale tossicologico ed una regolamentazione da parte delle autorità.

Ulteriori approfondimenti ed analisi statistiche dei dati ottenuti dai *microarrays*, potranno contribuire ad individuare, per esempio, fattori di trascrizione comunemente alterati, e un confronto con il profilo di espressione genica indotto da altre molecole cancerogene/tossiche, potrà portare al riconoscimento dei principali *pathways* molecolari alla base degli effetti di queste molecole naturali.

In conclusione, le osservazioni effettuate in questa tesi, mettono in luce, da un lato, i notevoli effetti positivi sulla salute, derivanti dal consumo di dosi alimentari di Brassicaceae o di prodotti altamente rappresentativi del vegetale di origine, mentre dall'altro, sottolineano le possibili conseguenze negative, risultanti dal consumo, a scopo preventivo, di alti dosaggi di *phytochemicals* isolati, che piuttosto, sembrerebbero conferire maggiori effetti protettivi nel loro "contesto naturale", grazie alle molteplici interazioni sinergiche e additive con le altre migliaia di molecole presenti all'interno del vegetale intero.

BIBLIOGRAFIA

- Abdel-Wahhab *et al.* J Agric Food Chem 2003, 51: 2409-14.
- Abdull Razis *et al.* Toxicology 2010, 277: 74-85.
- Abdull Razis *et al.* Lung Cancer 2011a, 71: 298-305.
- Abdull Razis *et al.* Arch Toxicol 2011b, 85: 919-27.
- Ahn *et al.* Curr Protein Pept Sci 2007, 8: 496-505.
- Aitio. Anal Biochem 1978, 85: 488-491.
- Alfadda *et al.* J Biomed Biotechnol 2012, 2012: 936486.
- An *et al.* Med Food 2010, 13: 406-14.
- Arai *et al.* Curr Opin Lipidol 2008, 19: 69-73.
- Asdaq *et al.* Appl Biochem Biotechnol 2010, 162: 358-372.
- Assayed *et al.* Mini Rev Med Chem 2009, 9: 1470-8
- Balmer *et al.* Hum Mol Genet 2012, 21: 4104-4114.
- Bernardi *et al.* J Agric Food Chem 2003, 51: 2737-2744.
- Bhandari *et al.* Hum Exp Toxicol 2011, 30: 1313-21.
- Bheemreddy *et al.* J Agric Food Chem 2007, 55: 2861-2866.
- Björkman *et al.* Phytochemistry 2011, 72, 538-556.
- Bones *et al.* Phytochemistry 2006, 67: 1053-67.
- Box *et al.* New York: Willey 1978: 80-82.
- Bradshaw *et al.* Clin Toxicol (Phila) 2009, 47: 632-42.
- Bruce. Methods Enzymol 1967, 10: 551-553.
- Burke *et al.* Biochem Pharmacol 1985, 34: 3337-3345.
- Cheung *et al.* AAPS J 2010, 12: 87-97.
- Choi *et al.* Oncology Letters 2011, 2: 1047-1051.
- Chow *et al.* In Euler Diagrams 2005, Paris.
- Christen *et al.* Chimia (Aarau) 2012, 66: 320-3.
- Clarke *et al.* Pharmacol Res 2011, 64: 456-463.
- Conaway *et al.* Nutr Cancer 2000, 38: 168-78.
- Conaway *et al.* Chem Res Toxicol 2001, 14: 1170.
- Corti *et al.* Ligand Assay 2009, 14: 1.

Cramer *et al.* Nutr Cancer 2011, 63: 196-201.

Crowell *et al.* Toxicol Appl Pharmacol 2006, 211: 115-23.

Cwik *et al.* J Pharm Biomed Anal 2010, 52: 544-549.

Dashwood *et al.* Food Chem Toxicol 1989, 27: 385.

De Kruif *et al.* J Chem-Biol Interact 1991, 80: 303.

Denison *et al.* Annu Rev Pharmacol Toxicol 2003, 43: 309-34.

Dinkova-Kostova *et al.* PNAS 2002a, 99: 11908-11913.

Dinkova-Kostova *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A 2002b, 99: 11908-13.

Dinkova-Kostova *et al.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2007, 16: 847–851.

Dinkova-Kostova *et al.* Trends Mol Med 2012, 18: 337-47.

Drummond *et al.* Nat Rev Drug Discov 2010, 10: 453–471.

Du *et al.* J Biomed Sci 2010 17: S39.

Ernst *et al.* Free Radical Research 2011, 45: 941-949.

Ernster. Methods Enzymol 1967, 10: 309-317.

Fahey *et al.* Cancer Prev Res (Phila) 2012, 5: 603-11.

Fimognari *et al.* Mutat Res 2012, 750: 107-31.

Flohé *et al.* Methods Enzymol 1984, 105: 114-121.

Flück *et al.* Fundam Clin Pharmacol 2007, 21: 399-410.

Fuccella *et al.* “Trattato di farmacologia e terapia” 1998 Torino-UTET: 24-25.

Glatt *et al.* Mutat Res 2001, 482: 27-40.

Gonzalez-Castejon *et al.* Pharmacol Res 2011, 64: 438-55.

Guengerich. Mol Inter 2003, 3: 194-204.

Guengerich. The AAPS J 2006, 8: E101-E111.

Habig *et al.* J Biol Chem 1974, 249: 7130-7139.

Halliwell. Biochem Soc Trans. 2007, 35: 1147-50.

Halliwell *et al.* Nutr Rev 2012, 70: 257-65.

Handschin *et al.* Pharmacol Rev 2003, 55: 649-73.

Harvey *et al.* Sci Transl Med 2011, 3: 78ra32

Hawkey. J Antimicrob Chemother 2008, 62: 1-9.

Hayes *et al.* Eur J Nutr 2008, 47: 73-88.

Heinen *et al.* Int. J. Cancer 2012, 130: 147-158.

Hengstler *et al.* Drug Metab Rev 2000, 32: 81-118

Herr *et al.* Cancer Treat Rev 2010, 5: 377-383.

Holst *et al.* Nat Prod Rep 2004, 21: 425-47.

Honkakoski *et al.* Biochem J 2000, 347: 321-37.

IARC 2004, Handbook of cancer prevention. Vol. 9. IARC Press Lyon.

Kammers *et al.* BMC Bioinformatics 2011, 12: 478.

Kassahun *et al.* Chem Res Toxicol 1997, 10: 1228.

Keum *et al.* Mutat Res 2004, 555: 191-202.

Kiefer *et al.* Xenobiotica 1988, 18: 747-755.

King *et al.* Curr Drug Metab 2000, 1: 143-161.

Kohar *et al.* Free Radic Biol Med 1995, 19: 197-207.

Krishnaraj *et al.* Proc Amer Assoc Cancer Res 2004, 45: 735.

Krug *et al.* Arch Toxicol 2013, 87: 123-143.

Kwak *et al.* J Biol Chem 2003, 278: 8135-8145.

Landi *et al.* Free Radic Biol Med 1997, 22: 329-35.

Lee *et al.* Canc Lett 2005, 224: 171-184.

Leibelt *et al.* Toxicol Sci 2003, 74: 10-21.

Lenaz. IUBMB Life 2001, 52: 159-164.

Levonen *et al.* Biochem J 2004, 378: 373-382.

Lewis. Pharmacogenomics 2003, 4: 367-395.

Loo. J Nutr Biochem 2003, 14: 64-73.

Lowry *et al.* J Biochem 1951, 193: 265-275.

Lubet *et al.* Arch Biochem Biophys 1985, 238: 43-48.

MacDonald *et al.* Pharm Pharm Sci 2009, 12: 367-377.

Mackenzie *et al.* Anal Biochem 1980, 109: 362-368.

Marklund *et al.* Eur J Biochem 1974, 47: 469-474.

Matera *et al.* Food Chem 2012, 133: 563-572.

Matsuzawa-Nagata *et al.* Metabolism 2008, 57: 1071-7.

Meyer *et al.* Biochem J 1995, 306: 565-9.

Mizuno *et al.* Pharmacol Rev 2003, 55: 425-61.

Mukherjee *et al.* J Agric Food Chem 2008, 56: 609-617.

Müller *et al.* Nat Rev Genet 2003, 4: 315-321.

Murashima *et al.* Biofactors 2004, 22: 271–275.

Murata *et al.* Free Radic Biol Med 2000, 28: 797-805.

Nair *et al.* Acta Pharmacol Sin 2007, 28: 459-72.

Nash. Biochem J 1953, 55: 416-421.

Nebert *et al.* Lancet 2002, 360: 1155-62.

Neve *et al.* Anal. Bional. Chem 2008, 393:1075-1084.

Nguyen *et al.* Ann Rev Pharmacol Toxicol 2003, 43: 233-260.

Odermatt. Am J Physiol Renal Physiol 2011, 301: F919-31.

Oganesian *et al.* Carcinogenesis 1999, 20: 453-8.

Omura *et al.* J Biol Chem 1964, 239: 2370-8.

Orellana *et al.* Rev Med Chile 2004, 132: 85-94.

Palmieri *et al.* Analytical Biochemistry 1982, 123: 320-324.

Paolini *et al.* Mutat Res 1992, 281: 245-246.

Paolini *et al.* Trends Pharmacol Sci 1994, 15: 322-323.

Paolini *et al.* Mutat Res 1997, 387:17-34.

Paolini *et al.* Life Sci 1999, 65: PL75-9.

Paolini *et al.* Mutat Res 2003, 543: 181-9.

Paolini *et al.* Trends Pharmacol Sci 2004a, 25: 124-129.

Paolini *et al.* Carcinogenesis 2004b, 25: 61-7.

Park *et al.* Arch Pharm Res 2009, 32: 109–115.

Perocco *et al.* Mutat Res 2006, 595: 125-36.

Ping *et al.* Eur J Pharmacol 2011, 650: 656-662.

Reinke *et al.* Drug Metab Disp 1985, 13: 548-552.

Riedl *et al.* Clin Immunol 2009, 130: 244-251.

Robbins *et al.* 2011, 76: C454-461.

Robert *et al.* Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods 2001, I ed.
CRC Series in Modern Nutrition.

Rocha *et al.* Curr Pharm Des 2011, 17: 4061-75.

Rodriguez-Cantu *et al.* J Agric Food Chem 2011, 59: 1095–1103.

Rungapamestry *et al.* Proc Nutr Soc 2007, 66: 69-81.

Rushmore *et al.* Curr Drug Metab 2002, 3: 481-490.

Sankhari *et al.* J Sci Food Agric 2012, 92: 1688-93.

Sapone *et al.* J Biomed Biotechnol 2012, 2012: 790987.

Scalbert *et al.* J Nutr 2000, 130: 2073S-85S.

Scott *et al.* PNAS 2003, 100: 13196-13201.

Shapiro *et al.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1998, 7: 1091-100.

Shapiro *et al.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2001, 10: 501-8.

Sheehan *et al.* Biochem J 2001, 360: 1-16.

Slavin *et al.* Adv Nutr 2012, 3: 506-16.

Sporn *et al.* Nat Rev Cancer 2002, 2: 537-543.

Stan *et al.* J Cell Biochem 2008, 104: 339-56.

Steinkellner *et al.* Mutat Res 2001, 480-481: 285-97.

Steinbrecher *et al.* Ann Nutr Metab 2009, 54: 87-96.

Stoner *et al.* Environ Health Perspect 1997, 105: 945-954.

Stoner *et al.* Carcinogenesis 2002, 23: 265-72.

Suganuma *et al.* Biochem Biophys Res Commun 2011, 405: 146-51.

Talalay *et al.* Adv Enzyme Regul 1978, 17: 23-36.

Talalay. Adv Enzyme Regul 1989, 28: 237-50.

Talalay. Biofactors 2000, 12: 5-11.

Talalay *et al.* J Nutr 2001, 131: 3027S-3033S.

Thimmulappa *et al.* Cancer Res 2002, 62: 5196-5203.

Toyama *et al.* Environ Health Perspect 2011, 119: 1117-1122.

Traka *et al.* Plant Cell 2011, 23: 2483-97.

Valgimigli *et al.* Environ Mol Mutagen 2009, 50: 222-37.

Valko *et al.* Int J Biochem Cell Biol 2007, 39: 44-84.

Vasanthi *et al.* Mini Rev Med Chem 2009, 9: 749-59.

Volden *et al.* J Agric Food Chem 2008, 56: 2068-73.

Wang *et al.* J Biol Chem 2009, 284: 26742-26748.

Wang *et al.* J Neurotrauma 2012, 29: 936-945.

Waqar *et al.* World Applied Sciences Journal 2010, 8 107-112.

Warrd *et al.* Toxicology in Vitro 2008, 22: 396-410.

Weber. Pharmacogenetics 1997, Oxford University Press, New York.

Werck-Reichhart *et al.* Genome Biol 2000, 1: REVIEWS3003.

Wheeler *et al.* Anal Biochem 1990, 184: 193-199.
Wilkinson. N Engl J Med 2005, 352: 2211-21.
Woo *et al.* Toxicology in Vitro 2008, 22: 1840-1845.
Xu *et al.* Arch Pharm Res 2005, 28: 249-268.
Yagi. Methods in molecular biology 1998, 108: 101-106.
Yazdanparast *et al.* Chem Biol Interact 2008, 172: 176-84.
Ye *et al.* Clin Chim Acta 2002, 316: 43.
Zhang *et al.* Proc Natl Acad Sci USA 1992, 89: 2399-2403.
Zhang *et al.* Biochem Biophys Res Commun 1995, 206: 748.
Zhang. Carcinogenesis 2001, 22: 425-31.
Zhang. Mutat Res 2004, 555: 173-90.
Zhang. Crit Rev Food Sci Nutr 2012a, 52: 525-32.
Zhang. Carcinogenesis 2012b, 33: 2-9.
Zhao *et al.* J Neurosci Res 2005, 82: 499–506.