



Università degli Studi di Palermo



Ministero dell'Università e della Ricerca  
Scientifica e Tecnologica

**Facoltà di Farmacia**  
**Dottorato di Ricerca in Scienze Farmaceutiche**  
**A.A 2008-2009 XXIII Ciclo**

---

*Il fitochimico indicaxantina previene stress ossidativo, arresto  
del ciclo cellulare ed apoptosi indotta da  
7-ketocolesterolo in monociti-macrofagi umani in coltura*



Dr. Alessandro Attanzio

**Docente guida**  
Dr. Carla Gentile

**Coordinatore del dottorato:**  
Chiar.mo Prof. Girolamo Cirrincione

---

DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE MOLECOLARI E BIOMOLECOLARI (STEMBIO)

# PHYTOCHEMICAL INDICAXANTHIN PREVENTS 7-ketoCHOLESTEROL-INDUCED OXIDATIVE STRESS, CELL CYCLE ARREST AND APOPTOSIS IN HUMAN MONOCYTES- MACROPHAGES

---

## Abstract

Dietary phytochemicals are widely investigated in the field of chemistry, biology, pharmacology and medicine for their potential health-promoting effects. Indeed, many *in vitro* studies provide evidence that a number of these compounds may affect redox-sensitive bio-signaling cell pathways involved in the pathogenesis of chronic disorders such as cancer and cardiovascular diseases, which could finally contribute to their prevention and/or control.

Characteristic phytochemicals of cactus pear (*Opuntia ficus indica*, L.Mill), the betalain pigments betanin and indicaxanthin, have been the object of our studies for years. In particular, reducing properties of indicaxanthin (Ind) have been shown to confer the molecule lipoperoxyl radical-scavenging activity in various either chemical or biological models from liposomes to red blood cells and low density lipoproteins. The cellular effects of antioxidants do not simply depend on their free radical chain-breaking activity. By virtue of their properties these compounds may effectively help to maintaining the cell redox environment thus preserving cell behavior and function. We have recently found that Ind has remarkable anti-inflammatory effects in cells and *in vivo*. This work investigated the activity of Ind in human monocytes-macrophages (THP-1 cells) submitted to the inflammatory action of 7-ketocholesterol (7-KC), a major dietary oxysterol suggested to have an active role in the development of the human atherosclerotic plaque. Indeed 7-KC, that accumulates in the plaque, can trigger signaling pathways in macrophages leading to cell inflammation and apoptosis. This, not only prevents the phagocytic cells to get rid of cholesterol and other material at the atherosclerotic lesion, but also contributes to further development of the lesion. Our previous studies showed that indicaxanthin is highly bioavailable in humans, reaching micromolar plasma concentrations after ingestion of 500 g of cactus pear fruit pulp. Then, in this work we were able to mimic a pathophysiological environment by using amounts of 7-KC and Ind known to be present at the plaque and plasma level, respectively. Our results show that Ind at 1.0 to 2.5  $\mu\text{M}$  dose-dependently inhibits the formation of reactive oxygen species induced by 16  $\mu\text{M}$  7-KC, prevents depletion of reduced glutathione, the loss of mitochondrial membrane potential, the membrane exposure of phosphatidylserine and the arrest of the cell cycle at G0-G1 in THP-1 monocytic cells. At the same time, Ind inhibits 7-KC induced increase of cytosolic-free  $\text{Ca}^{2+}$ .

Discovering the activity of phytochemicals at the level of specific pathways is now considered the basis to suggest either preventive dietary strategies or eventually therapeutic interventions. Our previous and present findings contribute to suggest Ind as a promising nutraceutical compound.

---

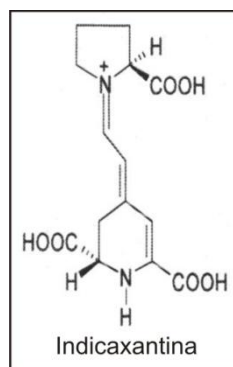
## Introduzione

E' noto che la cosiddetta "dieta mediterranea", almeno quella classica ricca di frutta e verdura, è capace di ritardare o impedire l'insorgere di una ampia varietà di stati patologici che hanno oggi un forte impatto sulla civiltà occidentale. Di fatto, alcuni dei componenti presenti nelle piante edibili (**fitochimici**) suscitano oggi notevole interesse per i potenziali effetti positivi nel mantenimento del benessere. Fra queste molecole, alcune potrebbero agire come veri e propri farmaci, tanto che è stato coniato per esse il termine di "**nutraceutico**" ad indicarne le capacità di prevenire o modificare stati patologici. Alla luce di una grandissima mole di studi, tali composti potrebbero avere una gran quantità di azioni e modulare pathways molecolari in cellule e tessuti.

E' ormai definitivamente accertato che il benessere organico si basa su un appropriato stato redox. In milioni di anni di evoluzione, infatti, gli organismi aerobi si sono adattati a produrre ossidanti (specie reattive di ossigeno, ROS), così come a sfruttare un efficace macchinario antiossidante per gestire **percorsi di segnalazione endocellulari redox-sensibili** che controllano vari processi che comprendono, fra gli altri, differenziazione e proliferazione, infiammazione ed apoptosi. Una quantità di eventi patogenetici si sviluppano nel momento in cui il normale bilancio fra ossidanti e antiossidanti che si instaura nelle cellule viene sconvolto da eventi endogeni o da agenti esterni. In condizioni di stress la difesa endogena potrebbe non essere sufficiente, così che tutti i meccanismi di controllo cellulare redox-dipendenti vengono alterati. Nasce in tale contesto la necessità di introdurre molecole redox-attive che possano, in via preventiva, aiutare a mantenere il bilancio redox cellulare ed, eventualmente, modificare in senso positivo uno squilibrio già instaurato. A questo scopo l'azione delle vitamine antiossidanti, vitamina A, E, C, carotenoidi, è ben nota e caratterizzata. Più recente è invece la conoscenza dell'azione redox-modulatoria di fitochimici, dai bioflavonoidi ai fitosteroli, dai terpenoidi ai glucosinolati, capaci di modulare, a vario livello, percorsi di segnalazione redox-sensibili con attività antiossidante e citoprotettiva. Sebbene spesso negli studi volti a dimostrare la bioattività di vari fitochimici presenti nella dieta non se ne faccia menzione, va precisato che qualsiasi azione *in vitro* non potrà avere alcun senso se non viene prima dimostrato che il composto in questione viene assorbito, ed in quantità sufficiente a svolgere un'azione.

I molti studi che dimostrano la stretta correlazione tra l'insorgenza di patologie caratterizzate da eziologia infiammatoria e la minore assunzione di frutta e verdura mettono in evidenza come gli antiossidanti della dieta possano svolgere un

ruolo fondamentale nella prevenzione di malattie cronico-degenerative. Le betalaine sono pigmenti naturali di colore rosso e giallo che si trovano quasi esclusivamente nelle piante dell'ordine delle Caryophyllales, includendo la *Beta vulgaris* L. e l' *Opuntia Ficus Indica* (L. Mill), e in alcuni generi di funghi. Molti studi volti a ricercare bioattività dei pigmenti betalainici sono stati recentemente condotti. E' stato riportato che indicaxantina (Ind), pigmento giallo del frutto di fico d'India, possiede una efficace attività lipoperoxyradical-scavenger sia in modelli chimici che biologici. Inoltre, studi eseguiti in modelli cellulari *in vitro*, hanno mostrato che il fitochimico può agire come bio-modulatore di percorsi di trasduzione endocellulari redox-sensibili. L'indicaxantina è infatti in grado di proteggere cellule endoteliali da disfunzione da TNF- $\alpha$  e di contrastare il processo di attivazione di linfociti [1][2][3].



Differentemente dalla maggior parte dei fitochimici, l'indicaxantina è risultata piuttosto stabile alle condizioni digestive intestinali, non è metabolizzata da enterociti e da epatociti ed è altamente **biodisponibile** nell'uomo, raggiungendo nel plasma concentrazioni micromolari dopo ingestione di 500 g di polpa di frutto. E' stato, inoltre, dimostrato che l'indicaxantina si ripartisce nelle membrane plasmatiche degli eritrociti e viene incorporata anche in lipoproteine plasmatiche circolanti, conferendo a cellule e particole resistenza ad ingiuria ossidativa [4][5][6][7][8][9].

L'aterosclerosi è oggi considerata una patologia infiammatoria cronica del tessuto vascolare. I principali responsabili del processo sono considerati gli alti livelli serici di LDL ed una alterata risposta delle cellule del sistema immunitario. LDL ossidate (oxLDL), e prevalentemente i derivati dal colesterolo, provocano una iniziale degenerazione delle cellule endoteliali arteriali con aumentata adesione di Monociti-Macrofagi e di T-Linfociti, cui segue un incremento della loro migrazione nello spazio sottoendoteliale [10][11].

Monociti e Linfociti, rilasciando citochine ad elevata attività chemotattica, richiamano altre cellule fagocitiche verso l'area infiltrata. L'incrementato *uptake* di oxLDL da parte dei monociti-macrofagi nell'intima vasale, le converte in "*Foam Cells*" (cellule schiumose) che, a seguito di morte per apoptosi, rilasciano il materiale lipidico, esacerbando il processo infiammatorio e l'ulteriore deposizione di striscia lipidica [12].

Il termine "aterosclerosi", quindi, indica un insieme di modifiche del tessuto muscolare sottoendoteliale costituite da un accumulo locale di lipidi, di complessi glucidici, di sangue e prodotti di origine ematica, di tessuto fibroso e di depositi di calcio, con mutamenti della tonaca media delle arterie. Prodotti ossidati di colesterolo, noti come ossisteroli, sono oggi considerati importanti nella patogenesi del processo aterogenico [13][14].

Gli ossisteroli possono essere di origine endogena o provenienti dalla dieta e circolano in quantità considerevole in tutte le frazioni lipoproteiche specialmente in soggetti ipercolesterolemici.

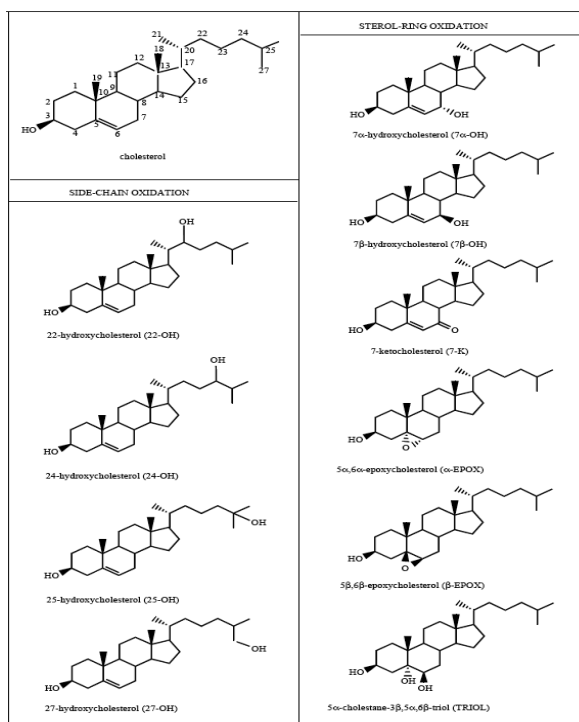
Gli ossisteroli più comuni negli alimenti di origine animale sono gli  $\alpha$ -eossidi, il 7-chetocolesterolo, il 7 $\alpha$ -idrossicolesterolo, il 7 $\beta$ -idrossi colesterolo, il 20 $\alpha$ -idrossicolesterolo e il 25-idrossicolesterolo [15].

Tali composti sono ritenuti giocare un ruolo importante come mediatori reattivi nell'evoluzione aterogenica, nel metabolismo lipidico, nell'aggregazione piastrinica, nell'apoptosi e nel cambiamento strutturale del distretto vasale affetto dal processo aterosclerotico. Inoltre, esercitano attività citotossica, angiotosica, carcinogena e mutagena in un vasto numero di cellule [16][17].

Essi probabilmente contribuiscono anche all'*uptake* recettoriale di LDL ossidate modificandole strutturalmente e determinandone un accumulo nello spazio subintimale dei grossi vasi arteriosi.

In tale distretto gli ossidi del colesterolo amplificano i danni patogenetici dello stato cronico infiammatorio aumentando la chemiotassi e attivazione delle cellule fagociti che [18].

Gli ossisteroli di interesse patofisiologico attivano meccanismi di trasduzione del segnale regolando l'espressione genica e la sintesi di specifici mediatori molecolari come citochine infiammatorie e molecole di adesione [19].



Gli ossisteroli maggiormente presenti nelle oxLDL e nelle lesioni aterosclerotiche sono il 7 keto colesterolo (7-KC) e il 7-βidrossicolesterolo (7-βOHC) [20].

Il 7-KC un ruolo protagonista nella formazione e sviluppo della placca aterosclerotica, poiché, accumulandosi a livello subintimale, innesca in cellule monocito-macrofagiche percorsi infiammatori e di morte cellulare programmata [21]. In monociti THP1-macrofagi il 7-KC induce una segnalazione redox- mediata che attiva a cascata vie di trasduzione attivate da mitogeni quali MAPK, JNK/SAPK, p38, così come NF-κB, inducendo la trascrizione genica di citochine, chemochine e molecole di adesione cellulare cruciali per l'iniziazione della risposta infiammatoria e il reclutamento di cellule della serie bianca [22][23][24].

Stress cellulare indotto da 7-KC comporta la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e l'incremento quantitativo di tipiche proteine attivate durante i meccanismi di riparo del DNA tra cui ATM, p53, p21, 8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1), HSP70 e topoisomerasi IIβ [25][26][27][28].

Tale effetto si genera anche su cellule muscolari lisce della parete aortica e sull'endotelio contribuendo alla formazione del core lipidico di partenza [29].

L'apoptosi è contraddistinta come evento precoce dall'esternalizzazione della fosfatidilserina di membrana, seguita da una serie di programmi biochimici apoptotici.

L'apertura di specifici canali determina un aumento della concentrazione citosolica di Ca<sup>2+</sup>, il quale si comporta da secondo messaggero e induce un cambiamento conformazionale del sistema calmodulina/calcineurina [30].

Tale modifica strutturale porta a un decremento dello stato di fosforilazione del fattore pro-apoptotico Bad [31].

L'incremento intracellulare di Bad fosforilato su ser 136 induce uno stato di depolarizzazione mitocondriale con il rilascio di citocromo c, dell'AIF (apoptosis-inducing factor) e reclutamento delle pro-caspasi -3, -7, -8, -9. L'attivazione della caspasi 3 esecutrice di morte cellulare, induce il clivaggio della PARP (poli-ADP-ribosio polimerasi) e il rilascio dell'inibitore ICAD dall'endonucleasi CAD con il conseguente taglio internucleosomale del DNA. Inoltre il 7-KC è in grado di spingere verso la sovrapproduzione di ROS cooperando a uno stato di deenergizzazione del potenziale transmembrana mitocondriale e dei livelli intracellulari di glutatione ridotto (GSH) [32][33][34].

Lo studio della citotossicità del 7-KC condotto utilizzando concentrazioni simili a quelle presenti nella placca ateromatosa, riveste notevole interesse nella comprensione dell'instaurarsi di patologie cardiovascolari.

Il nostro studio è stato realizzato utilizzando come modello di infiammazione cellule monocito THP1-macrofagiche umane, simulando gli effetti del 7-KC a concentrazioni post prandiali e simili a quelle ritrovate nelle lesioni aterosclerotiche.

La scelta del citotipo monocito-macrofagico come prototipo di attivazione e di regolazione dello stress cellulare da parte di specie reattive dell'ossigeno (ROS), risulta opportuna data la stretta correlazione tra il processo infiammatorio e la formazione della placca ateromatosa.

In questo modello è stata investigata l'azione protettiva del fitochimico Ind.

I risultati ottenuti mostrano che Ind alla concentrazione (1-2.5  $\mu\text{M}$ ) che può essere raggiunta *in vivo* dopo l'ingestione di frutti di fico d'India è capace di prevenire/contrastare gli effetti pro-ossidanti, pro-infiammatori e pro-apoptotici *in vitro* indotti da 7-KC su cellule THP1 [8].

## **MATERIALI E METODI**

### **Linea cellulare umana THP1**

Le cellule THP1 (*American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA*) sono una linea cellulare di monociti-macrofagi di origine umana, ampiamente utilizzata per studi metabolici, infiammatori e sull'apoptosi.

Si tratta di cellule grandi con un nucleo, generalmente eccentrico e voluminoso, reniforme, con cromatina organizzata in densi aggregati collegati tra loro da materiale eucromatico. Nel citoplasma è possibile osservare oltre a mitocondri, reticolo endoplasmatico, apparato di Golgi e lisosomi, due tipi di granuli: i granuli

primari, a comparsa precoce, contengono arilsulfatasi, fosfatasi acida e perossidasi; i granuli secondari, a comparsa tardiva, contengono solamente catalasi (fig.1, appendice 2). Sulla superficie cellulare si osservano protrusioni a forma di cresta (undulopodi) e filiformi (filopodi). Nelle condizioni di coltura utilizzate, raddoppiano in 24-30 ore a concentrazioni cellulari non troppo diluite rimanendo in sospensione nel medium. Le THP1-macrofagi utilizzate nel range P2 – P15, derivano da stock di cellule conservate in azoto liquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ). Queste temperature permettono di conservare le cellule per un lungo periodo mantenendo inalterate le caratteristiche fisiologiche e biochimiche delle cellule, caratteristiche che tendono a mutare dopo un lungo tempo in coltura.

### **Condizione di coltura**

Dopo scongelamento, le cellule THP1- macrofagi, erano seminate e mantenute in fiasche da  $75\text{ cm}^2$  in presenza di 14 ml di terreno RPMI 1640 completo (*Invitrogen*, 52400; L-Glutamine, 25mM HEPES). Le cellule erano coltivate a  $37^{\circ}\text{C}$  in atmosfera umidificata e al 5% di  $\text{CO}_2$ . Raggiunta la confluenza, le cellule erano amplificate. Il terreno era sostituito ogni 3 giorni con medium fresco.

Per gli esperimenti, cellule erano seminate in piastre da 24 pozzetti alla densità di  $5 \times 10^5$  cells/ml. Il 7-KC (*Sigma*, C2394-100mg) era solubilizzato in THF ed aggiunto alla concentrazione finale di  $16\mu\text{M}$  in tutte le prove. Tale concentrazione è rappresentativa del valore di 7-KC misurato a livello di una placca aterosclerotica [13].

La concentrazione finale di THF era 0,1 % (v:v). Studi preliminari di tossicità, condotti sulle THP1-macrofagi, hanno constatato la completa assenza di effetti tossici del THF a tale concentrazione. L'Ind era solubilizzata in PBS e saggiata nel range di concentrazione 0,1 -  $2,5\mu\text{M}$ . Cellule controllo erano incubate in RPMI completo implementato con THF 0.1% (v:v). Le prove sono state eseguite in triplicato per ogni condizione analizzata.

### **Valutazione della vitalità cellulare mediante conta diretta con Trypan blue**

Il trypan blue (*Sigma*, T-8154) è un colorante impermeabile alle cellule integre ed in grado di penetrare esclusivamente nelle cellule morte. Il motivo per cui questo colorante non colora le cellule vive è da ricercarsi nell'estrema selettività della membrana cellulare. Il numero di cellule vitali non colorate e di quelle morte (colorate in blu) è stata determinata attraverso conta ottica al microscopio (*Olympus CK-40*). Le cellule erano risospese in una soluzione di Trypan blue (1:1) e contate utilizzando un emocitometro di Neubauer.



### **Studio dell'apoptosi mediante microscopia a fluorescenza**

La morfologia apoptotica di cellule THP1 è stata messa in evidenza mediante osservazione al microscopio a fluorescenza delle cellule trattate con fluorocromi che intercalano gli acidi nucleici (arancio di acridina, etidio bromuro). Le cellule erano centrifugate per permettere l'adesione alla piastra. Dopo osservazione in campo chiaro, si è proceduto alla tecnica di colorazione. Dopo rimozione del terreno di coltura, le cellule sono state lavate con PBS e trattate con 100 µl di soluzione colorante contenente arancio di acridina ed etidio bromuro alla concentrazione di 100 µg/ml in soluzione di PBS. Dopo 20 secondi le cellule furono osservate al microscopio a fluorescenza. Le immagini FITC e ROD sono state acquisite sovrapposte (Merge) ed elaborate al computer (Leica, software). L'indicaxantina alla concentrazione utilizzata di 2,5 µM non alterava la fluorescenza basale dell'arancio di acridina. La distinzione delle cellule apoptotiche è permessa per la differente colorazione:

- l'arancio di acridina penetra in tutte le cellule colorandole di verde;
- l'etidio bromuro penetra soltanto nelle cellule morte conferendo una colorazione rossa che sovrasta il verde dell'acridina.

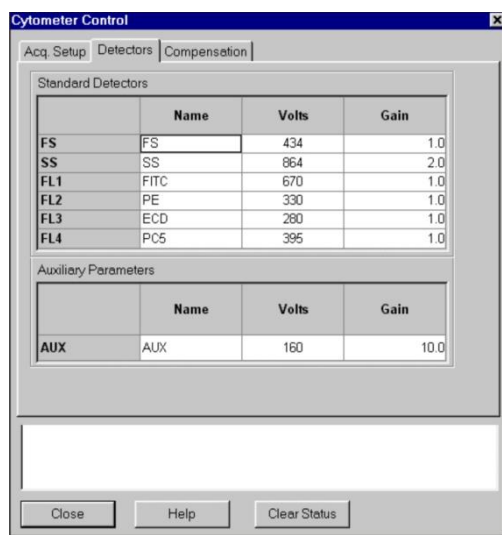
Riassumendo, è possibile distinguere:

- cellule vive colorate diffusamente di verde con nuclei di forma regolare;
- cellule vive colorate di verde, ma che presentano nuclei apoptotici con addensamenti cromatinici di un colore verde brillante;
- cellule morte per apoptosi, che presentano addensamenti cromatinici di colore rosso brillante;

### **Studio dell'apoptosi con Annessina V-FITC**

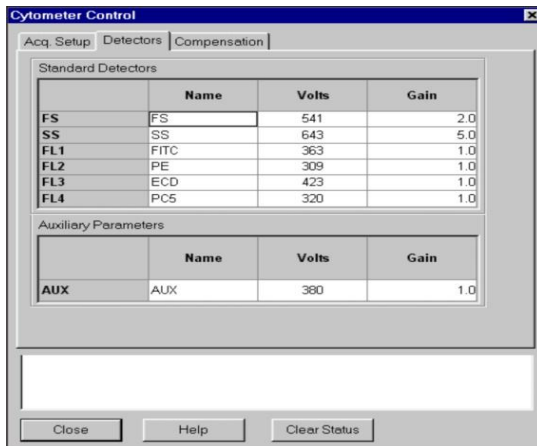
Nelle cellule apoptotiche, la fosfatidilserina di membrana (PS), è traslocata dalla parte interna della membrana plasmatica all'esterno. L'annessina V è una proteina di 35-36 kDa, che presenta un'alta affinità per PS e che lega il fosfolipide in maniera  $Ca^{+2}$ -dipendente quando lo stesso viene esposto dalle cellule. L'annessina V può essere coniugata a fluorocromi come FITC, e questo complesso mantiene la sua alta affinità per PS, venendo quindi utilizzato come marcatore sensibile per l'analisi citofluorimetrica delle cellule in apoptosi. L'esternalizzazione di PS è un evento iniziale dell'apoptosi e la marcatura con annessina V-FITC può identificare l'apoptosi ad uno stadio precoce, rispetto ad altre analisi basate sui cambiamenti nucleari, come la frammentazione del DNA. Le cellule erano raccolte, lavate con PBS freddo, centrifugate e risospese con binding buffer a una densità di  $1 \times 10^6$  cells/ml. Aliquote di  $1 \times 10^5$  cells, erano addizionate con 5 µl di Annexin V-FITC (cat. No. 51-65874X). Dopo 15 min di incubazione al buio a temperatura ambiente,

400 µl di binding buffer erano aggiunti e le soluzioni trasferite in opportuni tubi di analisi. I parametri di FS/SS e di fluorescenza (FL1 - FITC) del citofluorimetro (Beckman Coulter Epics XL- software EXPO 32) erano come riportati nel riquadro. Sono stati analizzati 10 mila eventi per ciascun campione entro un'ora.



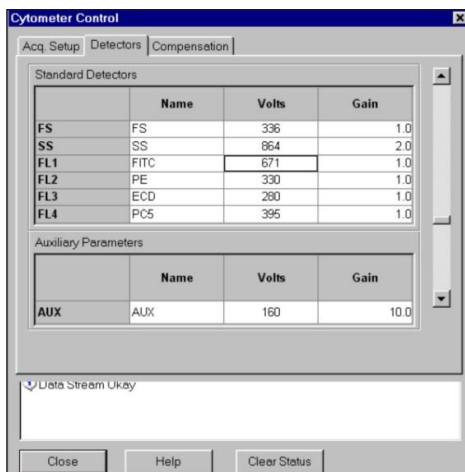
### Analisi citofluorimetrica del ciclo cellulare

L'uso dello ioduro di propidio (*Sigma, P4170*) in citofluorimetria permette di valutare la distribuzione della popolazione cellulare nelle diverse fasi del ciclo cellulare. Per poter sottoporre un campione di cellule alla citofluorimetria a flusso è necessario isolare i nuclei, per facilitarne l'esposizione alla sonda fluorescente. Le cellule THP1 ( $5 \times 10^5$  cells/0,5 ml) erano raccolte per centrifugazione e lisate con tampone ipotonico (IP 50 µg/ml, 0,1% citrato di sodio, 0,1% Nonidet P-40), addizionato con 100 µg/ml RNAsi (*Sigma, R4875*). La degradazione di RNA è necessaria per evitare indesiderato legame tra la sonda fluorescente e l'acido ribonucleico. Lo ioduro di propidio, quindi si legherà stabilmente ed in maniera stechiometrica soltanto con il DNA. L'istogramma fluorescente consente una quantificazione della percentuale di cellule nelle fasi, sfruttando il diverso contenuto di DNA delle cellule nelle fasi G1, S, G2/M. In fase G2-M avranno, infatti, un corredo tetraploide, doppiamente fluorescente rispetto ad un normale corredo diploide, come può essere quello di una cellula in G0-G1, mentre avranno una fluorescenza intermedia i nuclei in fase S. Dopo incubazione per 45 minuti a 37 °C e in assenza di luce, i nuclei furono analizzati entro un'ora al FACS secondo i parametri di FS e SS e di fluorescenza (FL3 - PE) come riportati nel riquadro, acquisendo 10 mila eventi per ciascun campione.



### Valutazione della caduta del potenziale di membrana mitocondriale ( $\Delta\Psi_m$ )

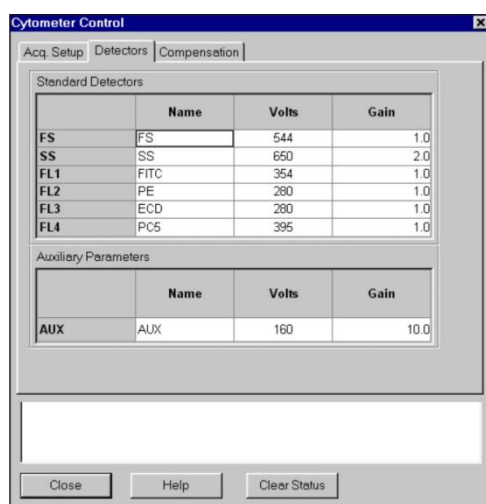
La perdita del potenziale della membrana mitocondriale è uno dei primi eventi intracellulari dopo l'induzione dell'apoptosi e coincide con l'aumento della permeabilità mitocondriale, portando infine al rilascio del citocromo c. La valutazione del potenziale della membrana mitocondriale può essere, valutata citofluorimetricamente utilizzando un catione lipofilo fluorescente, come il DiOC6 (3,3-dihexyloxacarbocyanine, Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA). Essendo lipofilo, tale composto ha la possibilità di attraversare la membrana, sfruttando il gradiente elettrochimico. In tal modo, esso riesce ad accumularsi nella matrice mitocondriale con una velocità tanto maggiore, quanto maggiore è la differenza di potenziale della membrana mitocondriale. L'unità di fluorescenza media è stata misurata in cellule THP1 dopo incubazione al buio a 37°C con il colorante (40 nmol/L) aggiunto 15-30 minuti prima la fine del time-course. Le cellule lavate e centrifugate furono risospese in PBS a una densità di  $5 \times 10^5$  cells/0,5 ml ed analizzate al citofluorimetro (con eccitazione ed emissione settati a 488 e 525 nm rispettivamente) secondo i parametri di FS e SS e di fluorescenza (FL1- FITC) riportati nel riquadro, acquisendo 10 mila eventi per ciascun campione.



## Analisi citofluorimetrica delle specie reattive dell'ossigeno

L'analisi citofluorimetrica per lo studio delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) utilizza una sonda fluorescente, la 2,7-diclorofluorescina diacetato (DCFH-DA, *Invitrogen*, C6827). Il principio di questa analisi si basa sul fatto che il DCFH-DA diffonde attraverso la membrana cellulare ed è idrolizzato dalle esterasi intracellulari in di-idrodiclorofluorescina (DCFH) non fluorescente. In presenza di ROS, la DCFH è rapidamente ossidata e trasformata in diclorofluoresceina (DF), molecola altamente fluorescente.

L'unità di fluorescenza media è stata misurata in cellule dopo incubazione al buio a 37°C con DCFH-DA (10 µM) aggiunta 30 minuti prima della fine del time-course. Le cellule lavate e centrifugate furono risospese in PBS a una densità di  $3 \times 10^5$  cells/0,5 ml ed analizzate al citofluorimetro secondo i parametri di FS e SS e di fluorescenza (FL1 - FITC) riportati nel riquadro, acquisendo 10 mila eventi per ciascun campione. L'indicaxantina non alterava la fluorescenza basale della DF.



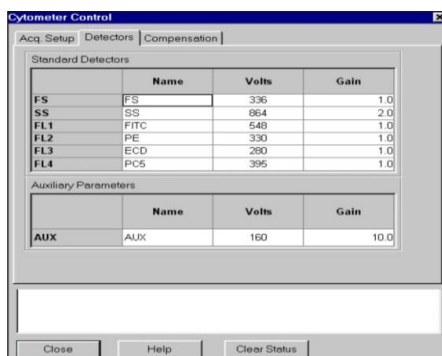
## Valutazione del contenuto dei tioli cellulari

La maggior parte di proteine contengono gruppi sulfidrilici (Prot-SH o PSH) dovuti ai residui di cisteina. Essendo parte integrante delle strutture proteiche che li contengono, il contenuto cellulare di questi gruppi è molto più alto dei livelli di glutatione (GSH) intracellulare. I PSH possono presentarsi sotto forma di tioli (-SH), disolfuri (PS-SP), o disolfuri misti (per esempio PS-SG se coniugati con il GSH). Quest'ultima specie è indubbiamente la più abbondante e la più variabile. L'ossidazione della forma tiolica, o la riduzione di un gruppo disolfuro di un enzima, può determinare l'attivazione o l'inattivazione della funzione catalitica. La reazione di S- tiolazione/detiolazione è un processo dinamico che avviene in condizioni fisiologiche. È reversibile, ma la velocità di reazione può variare in funzione della natura del gruppo tiolico all'interno dell'ambiente chimico generato

dalla struttura proteica. La reazione di ossidazione dei sulfidril proteici a disolfuri, è una modifica precoce causata da stress ossidativo. I tioli proteici possono quindi giocare un ruolo nella difesa antiossidante e influenzare in questo modo l'ambiente redox intracellulare. Terminata la fase di stress ossidativo, i sulfidril proteici possono ritornare a far parte del pool tiolico cellulare mediante reazione del GSH. A sua volta il GSH verrà rigenerato a partire dal GSSG, mediante catalisi enzimatica operata dall'enzima glutatione reduttasi. Nel nostro studio il contenuto in tioli cellulari totali è stato valutato con il reattivo di Edman, come segue. Le cellule sono state raccolte, centrifugate (5 minuti a 2000 rpm), risospese con PBS freddo e lisate per sonicazione. La sospensione cellulare ( $1 \times 10^6$  cells/ml) è stata mescolata con SDS al 10% e il reattivo acido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) alla concentrazione 30  $\mu$ M. La miscela è stata posta ad incubare per 40 minuti a temperatura ambiente. Successivamente, si è proceduto a lettura spettrofotometrica a 412 nm. I valori sono stati espressi come % del campione controllo.

### Valutazione del $\text{Ca}^{+2}$ intracellulare

La concentrazione intracellulare dei livelli di  $\text{Ca}^{+2}$  è stata misurata mediante il fluoroforo Fluo-3 AM (*Santa Cruz, sc-202612*), il quale aumenta l'intensità di fluorescenza emessa dopo legame con  $\text{Ca}^{+2}$ . Le esterasi intracellulari deacetilano il Fluo-3 AM rendendolo impermeabile alla membrana plasmatica. È utile non usare terreni contenenti siero dal momento che quest'ultimo contiene attività esterasica che potrebbe convertire il reagente nella sua forma impermeabile al di fuori della cellula. La fluorescenza media è stata misurata dopo incubazione al buio a  $37^\circ\text{C}$  con il Fluo-3 AM alla concentrazione finale di  $2\mu\text{M}$ , aggiunto 40 minuti prima della fine del time-course. Le cellule lavate e centrifugate furono risospese in PBS privo di  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  alla densità di  $3 \times 10^5$  cells/0,5ml ed analizzate al citofluorimetro (con eccitazione ed emissione settati a 488 e 526 nm rispettivamente) secondo i parametri di FS e SS e di fluorescenza (FL1 - FITC) riportati nel riquadro, acquisendo 10 mila eventi per ciascun campione. La fluorescenza del fluo-3 AM era stabile per almeno 1 ora.



### **Valutazione della localizzazione intracellulare del fitochimico Indicaxantina**

Le cellule THP1-macrofagi sono state centrifugate per permettere l'adesione alla piastra. Dopo osservazione in campo chiaro, le cellule sono state lavate con PBS e trattate con Ind alla concentrazione 100  $\mu\text{M}$  per 20 minuti a temperatura ambiente. La piastra era sottoposta ad osservazione al microscopio a fluorescenza (Leica) a tempi diversi. Per valutare la vitalità cellulare e l'integrità della membrana plasmatica è stato utilizzato l'etidio bromuro (100  $\mu\text{g/ml}$ ) che penetra soltanto le cellule morte conferendo una colorazione rossa.

L'analisi al microscopio a fluorescenza (Leica) è stata realizzata acquisendo le immagini FITC e ROD ed elaborazione (Leica, software) dell'immagine sovrapposta (Merge) al computer.

## **RISULTATI**

### **Effetti protettivi di indicaxantina sulla citotossicità indotta dal 7-KC in THP1-macrofagi**

Incubazione per 24 ore di THP1-macrofagi con 7-KC 16  $\mu\text{M}$ , concentrazione di interesse patofisiologico, causava un decremento della crescita cellulare, rispetto alla condizione controllo pari a circa il 31% (fig.2A, appendice 2). Quando le cellule erano simultaneamente incubate con 7-KC e Ind, in un range di concentrazioni 0.1-2.5  $\mu\text{M}$ , il numero delle cellule vitali aumentava al crescere della concentrazione del fitochimico indicando un chiaro effetto citoprotettivo (fig.2A, appendice 2). Indicaxantina a concentrazione 2.5  $\mu\text{M}$  preveniva totalmente l'effetto citotossico del 7-KC almeno fino a 72 ore (fig.2B, appendice 2). Ind a 2,5  $\mu\text{M}$  non modificava la crescita delle THP1 (non mostrato), evidenziando così la peculiare azione della molecola sul pathway di segnale trasdotto dal 7-KC [13].

### **Effetto protettivo di indicaxantina sulle variazioni morfologiche indotte da 7-KC in cellule THP1**

Attraverso l'utilizzo congiunto di specifici fluorocromi che intercalano gli acidi nucleici, come l'Arancio di Acridina e l'Etidio Bromuro (AO/EB), è possibile studiare le variazioni morfologiche di cellule in apoptosi. L'Arancio di Acridina penetra in tutte le cellule colorandole di verde, mentre l'etidio bromuro penetra soltanto nelle cellule morte, conferendo una colorazione rossa che sovrasta il verde dell'acridina. Colture di THP1-macrofagi esposte a 7-KC 16  $\mu\text{M}$  per 24 ore a 37°C mostravano cellule vive, ma con nuclei apoptotici che presentavano addensamenti di colore verde intenso, insieme ad un gran numero di cellule morte con addensamenti cromatinici di colore rosso e corpi apoptotici (fig.3, appendice

2). Inoltre era possibile osservare cellule vive colorate di verde, ma con nuclei apoptotici con addensamenti cromatinici di un colore verde brillante (A) e blebbing di membrana (B) e cellule morte per apoptosi (C), che presentavano addensamenti cromatinici di colore rosso brillante e corpi apoptotici. Le colture co-incubate in presenza di 7-KC e di Ind 2,5  $\mu$ M mostravano cellule morfologicamente identiche alla coltura controllo e nessuna evidenza di variazione citologica pro-apoptotica (fig.3, appendice 2). L'indicaxantina alla concentrazione utilizzata di 2,5  $\mu$ M non alterava la fluorescenza basale dell'AO.

### **Effetto protettivo di indicaxantina sull'apoptosi indotta da 7-KC in cellule THP1**

Il programma apoptotico è caratterizzato da particolari aspetti morfologici, che includono la perdita dell'adesione e dell'asimmetria della membrana plasmatica, la condensazione del citoplasma, del nucleo, e il taglio internucleosomale del DNA. La modifica della distribuzione dei fosfolipidi della membrana plasmatica è uno degli eventi più precoci. Nelle cellule apoptotiche, la fosfatidilserina (PS), è traslocata dalla faccia interna della membrana plasmatica a quella esterna. L'Annessina V è una proteina che presenta un'alta affinità per PS e che lega il fosfolipide solo quando lo stesso viene esposto. Utilizzando Annessina V-FITC il legame può essere determinato mediante analisi citofluorimetrica. Le cellule THP1-macrofagi erano incubati con 7-KC alla concentrazione 16 $\mu$ M in presenza o in assenza di Ind 2,5  $\mu$ M per 16 ore a 37°C e quindi sottoposte ad analisi FACS dopo trattamento con Annessina V-FITC. Figura 4A, appendice 2 mostra un incremento della fluorescenza rispetto al controllo dovuto all'esposizione di PS, confermando l'effetto pro-apoptotico dell'ossisterolo. Ind 2,5  $\mu$ M appare totalmente prevenire tale effetto. Infatti, cellule coincubate con 7-KC e Ind 2,5  $\mu$ M manifestano una mancata esternalizzazione della PS rimanendo negative all'Annessina V-FICT, cioè confinando la fluorescenza alla prima decade, come in cellule controllo. I citogrammi mostrati nella fig. 4B, appendice 2 mostrano che cellule incubate con 7-KC si presentano più piccole, raggrinzite e più granulose, rispetto alla condizione di co-trattamento 7-KC-Ind, dove l'assetto citologico viene mantenuto identico alla condizione controllo.

### **Effetto di indicaxantina sulla variazione della dinamica del ciclo cellulare indotta da 7-KC in cellule THP1**

Effetto del 7-KC sulla dinamica del ciclo cellulare di cellule THP1 fu investigato mediante trattamento delle cellule con ioduro di propidio ed analisi citofluorimetrica. A questo scopo THP1-macrofagi sono stati incubati con 7-KC 16

$\mu\text{M}$  per 24 ore a  $37^\circ\text{C}$  in assenza o in presenza di Ind  $2,5 \mu\text{M}$ . 7-KC causava un cambiamento percentuale significativo delle cellule nelle differenti fasi del ciclo con un blocco in fase G0/G1 (fig.5A, appendice 2). Inoltre, a causa della comparsa di una evidente popolazione fluorescente come frazione subG0, si poteva concludere che le cellule erano indirizzate in fase pro-apoptotica. Infine, il pool cellulare mostrava anche un ridimensionamento della fase G2/M ed S (fig.5A, appendice 2). In aggiunta, osservazione microscopica a contrasto di fase, mostrava una progressiva rarefazione del numero cellulare e un cambiamento strutturale della normale citologia dei THP1-macrofagi.(fig.5B, appendice 2). Co-incubazione con Ind  $2,5 \mu\text{M}$  preservava totalmente le cellule dall'arresto in fase G0/G1 e ne manteneva la normale morfologia (fig.5B, appendice 2).

### **Influenza del 7-KC sul $\Delta\psi\text{m}$ mitocondriale in THP1-macrofagi ed effetto di indicaxantina**

Il mitocondrio funziona da centrale d'integrazione degli stimoli apoptotici. Essi possono essere di molteplice natura e causano l'assemblaggio di un complesso poliproteico sulla membrana mitocondriale esterna chiamato poro di transizione. Come risultato finale a seguito di swelling, il mitocondrio libera una serie di fattori che stimolano l'apoptosi. Fra questi Apoptosis Inducing Factor è in grado di raggiungere il nucleo ed attivare una via indipendente dalle caspasi in grado di degradare il DNA, ed il citocromo c che si lega alle proteine Apaf-1 (apoptotic protease activating factor) e caspasi 9, formando insieme ad ATP, un complesso definito apoptosoma. Questo complesso consente l'attivazione della caspasi 9 in grado di attivare altre caspasi (caspasi3) che danno il via ad una cascata molecolare che concludono il processo di morte per apoptosi. Per valutare il coinvolgimento mitocondriale nel processo apoptotico indotto da 7-KC, cellule THP1 sono state trattate con colorante lipofilo DiOC6. Quest'ultimo è in grado di accumularsi esclusivamente nei mitocondri che presentano un normale potenziale transmembrana, mentre è totalmente escluso in mitocondri nei quali, per effetto di danno nella membrana mitocondriale esterna, hanno subito una dissipazione del  $\Delta\psi\text{m}$ .

Rispetto a cellule controllo, il trattamento di THP1 con 7-KC  $16 \mu\text{M}$ , per 16 ore, causava una riduzione del potenziale transmembrana mitocondriale, come evidenziato dalla comparsa di un picco a bassa intensità di fluorescenza dopo colorazione con DiOC6 (fig.6, appendice 2). Co-incubazione delle cellule con indicaxantina  $2,5 \mu\text{M}$ , totalmente preveniva la perdita del potenziale indotto dall'ossisterolo (fig.6, appendice 2), dimostrando effetto protettivo del fitochimico sull'integrità del mitocondrio.



### **Influenza del 7-KC sul bilancio redox in cellule THP1-macrofagi ed effetto antiossidante di indicaxantina**

Stress ossidativo e danno alle strutture cellulari possono portare a morte per apoptosi. Molti dati di letteratura indicano che l'effetto pro-apoptotico di ossisteroli è indotto primariamente da uno squilibrio redox endocellulare. Per razionalizzare l'effetto protettivo di Ind su cellule THP1 ho studiato l'influenza del fitochimico sulla variazione dei livelli di ROS e dei tioli totali indotti dal 7-KC.

A questo scopo THP1-macrofagi sono stati trattati con 7-KC 16  $\mu\text{M}$  per 1 ora in assenza o in presenza di Ind 1 e 2,5  $\mu\text{M}$  e produzione di ROS è stata valutata mediante citofluorimetria dopo reazione con 2,7 diclorofluoresceina diacetato. 7-KC incrementava, rispetto alla condizione controllo, il livello di ROS di circa il 50% (fig.7, appendice 2).

Co-incubazione di Ind 1-2,5  $\mu\text{M}$  completamente contrastava l'effetto del 7-KC come dimostrato dall'istogramma citofluorimetrico che coincideva perfettamente con la condizione controllo (fig.7, appendice 2).

Gruppi tiolici di proteine e GSH, sono in grado di proteggere la cellula dalle specie reattive dell'ossigeno, interagendo direttamente con esse. In queste reazioni si originano tiol-radicali, che si neutralizzano mediante reazione di dimerizzazione con formazione del disolfuro corrispondente. Il livello di tioli endocellulari rappresenta quindi un parametro sensibile di stress ossidativo. THP1-macrofagi sono stati trattati con 7-KC 16  $\mu\text{M}$  in assenza o in presenza Ind. 7-KC causava un decremento di circa il 60% rispetto al controllo dei tioli totali dopo 1 ora di incubazione, corrispondente alla produzione di ROS intracellulari precedentemente riportata. Ind saggiata alla concentrazione 1 - 2,5  $\mu\text{M}$  preveniva in maniera dose dipendente la riduzione dei tioli indotta dall'ossisterolo confermando il suo effetto protettivo sull'equilibrio redox endocellulare (fig.8, appendice 2).

### **Incremento di $\text{Ca}^{2+}$ intracellulare indotto da 7-KC in THP1-macrofagi ed effetto di indicaxantina**

In tutti i tipi cellulari lo ione  $\text{Ca}^{2+}$  è un secondo messaggero molto importante per la trasduzione dei segnali intracellulari. Cambiamenti dinamici nella concentrazione di calcio in risposta a vari stimoli regola molti processi cellulari quali la proliferazione, la differenziazione e l'apoptosi. Durante l'apoptosi, l'aumento di calcio citosolico promuove nei mitocondri il rilascio di fattori pro-apoptotici. Un incremento della  $[\text{Ca}^{2+}]$  può essere ottenuto da un rapido e transiente rilascio dello ione dalle riserve intracellulari, o da un lento flusso in entrata dallo spazio extracellulare. E' stato dimostrato che 7-KC causa un iniziale incremento del calcio intracellulare con meccanismi non ancora identificati, ma

probabilmente riconducibili all'azione dell'ossisterolo su proteine di membrana, non caratterizzate, con il ruolo di sensori [35].

L'aumento della concentrazione del  $\text{Ca}^{2+}$ , causa l'attivazione di proteine citosoliche calcio dipendenti come le calpaine che agiscono a monte della catena apoptotica attivando Bax o Bad e partecipando alla proteolisi del citoscheletro. Ho valutato l'influsso di  $\text{Ca}^{+2}$  intracellulare indotto da 7-KC in cellule THP1 mediante l'uso del fluoroforo Fluo-3AM ed analisi citofluorimetrica. Tale fluoroforo lega il  $\text{Ca}^{+2}$  quantitativamente procurando incremento di fluorescenza all'interno delle cellule. Come è possibile osservare in fig.9, appendice 2 le cellule THP1-macrofagi esposte all'azione del 7-KC 16  $\mu\text{M}$  per 3 ore a 37°C, raggiungono elevati livelli citoplasmatici di  $\text{Ca}^{+2}$  come indicato dallo spostamento dell'istogramma verso alti livelli di fluorescenza. Al contrario, cellule trattate simultaneamente con 7-KC 16  $\mu\text{M}$  e Ind 2,5  $\mu\text{M}$  presentano un istogramma confinato e sovrapposto alla condizione controllo, dimostrando che il fitochimico contrasta completamente l'influsso di  $\text{Ca}^{+2}$  indotto dall'ossisterolo.

### **Permeazione di indicaxantina in THP1-macrofagi**

E' stato dimostrato che indicaxantina si ripartisce in membrane plasmatiche di eritrociti e viene incorporata in lipoproteine plasmatiche [7][8].

Con la conoscenza che indicaxantina presenta caratteristiche fluorescenti primarie con un massimo di emissione a 410 nm, potenziale diffusione della molecola all'interno delle cellule THP1-macrofagi è stata ricavata dopo incubazione delle cellule con il fitochimico (100  $\mu\text{M}$ ) mediante analisi al microscopio a fluorescenza. Come si osserva in fig.10 dopo 10 minuti di incubazione (fig.10B, appendice 2) il pigmento restava confinato sul bilayer fosfolipidico di membrana. Nei successivi 10 minuti di incubazione invece si registrava la comparsa di una fluorescenza verde diffusa all'interno della cellula che dimostra la permeazione del fitochimico, (fig.10C, appendice 2). Per escludere che questo risultato dipendesse da danno o alterazione della permeabilità di membrana, le cellule erano anche analizzate in presenza di etidio bromuro (100  $\mu\text{g/ml}$ ). Questa sonda fluorescente in ROD è capace di penetrare soltanto in cellule morte. Poiché a seguito del trattamento con etidio bromuro il segnale di fluorescenza delle cellule THP1 incubate con indicaxantina, non variava, si poteva escludere che la diffusione del fitochimico fosse causata da danni alla membrana, ma piuttosto confermava la capacità della molecola a ripartirsi in cellule umane.

## DISCUSSIONE

Un gran numero di molecole presenti nelle piante hanno mostrato la capacità di contrastare l'azione dei radicali liberi in diversi sistemi biologici, ed è per questo motivo che gli antiossidanti naturali presenti nei cibi vengono considerati costituenti importanti per i loro effetti positivi sulla salute. Lo studio presentato si pone nello scenario delle ricerche molecolari in campo alimentare e nutrizionale che da alcuni decenni stanno assumendo rilievo sempre crescente mano a mano che il binomio alimentazione e salute diventa sempre più evidente. I modelli sperimentali cellulari costituiscono uno strumento indispensabile per analizzare nuove ipotesi o per approfondire a livello molecolare i meccanismi che sottendono fenomeni osservati in modelli animali o postulati sulla base di osservazioni clinico-epidemiologiche.

La possibilità di preservare lo stato di buona salute o addirittura di curare malattie attraverso una sana alimentazione è ovviamente una prospettiva auspicabile e da perseguire. In parte tale possibilità è già oggi una realtà, almeno nel campo della prevenzione cardiovascolare. Grazie infatti ad un' enorme mole di studi, è oggi ampiamente dimostrato che la Dieta Mediterranea, riduce significativamente il rischio di sviluppare gravi malattie quali l'infarto miocardico, l'ictus cerebrale e il cancro. Tuttavia, tali studi non permettono di capire i meccanismi molecolari e cellulari coinvolti. La comprensione a questo livello è invece fondamentale per dare validità generale alle osservazioni, per individuare possibili variazioni delle risposte di individui o di sottogruppi di popolazione, per comprendere il peso del patrimonio genetico in tali risposte, per sviluppare nuove strategie terapeutiche ed applicazioni biotecnologiche, come quelle offerte da una nuova classe di sostanze definite oggi come "nutraceuticals" ovvero sostanze nutrizionali ad azione farmacologica. Le malattie cronico-degenerative sono malattie multifattoriali, dovute a fattori genetici ed ambientali e nella cui patogenesi è ormai dimostrato che lo stress ossidativo svolge un ruolo importante. Da tali considerazioni scaturiscono alcuni collegamenti di rilievo che hanno ispirato lo studio presentato in questo lavoro. L' alimentazione, attraverso i cibi naturalmente ricchi di antiossidanti, può fornire una valida difesa contro infiammazione e stress ossidativo.

Lo stress ossidativo è un fattore importante nello sviluppo dell'aterosclerosi. In particolare si ritiene che il metabolismo ossidativo delle LDL costituisca il punto di partenza nel processo aterosclerotico. Infatti sia *in vivo* che *in vitro*, le oxLDL provocano citotossicità delle cellule endoteliali con aumento della permeabilità

vascolare che porta ad un incremento del rischio di formazione di placche ateromatose.

Poiché il 7-KC, ossido del colesterolo, è il maggior componente nella placca ateromasica, vi è ragione di credere che le patologie cardiovascolari siano strettamente legate ai livelli di colesterolo ematico [36][37][38].

Un gran numero di studi hanno recentemente concluso che il 7-KC esercita effetti pro-infiammatori e pro-apoptotici su tutte le cellule che compongono il tessuto vascolare, come cellule endoteliali, muscolari lisce e cellule immunitarie. In particolare effetti apoptotici indotti da 7-KC su monociti-macrofagi appaiono responsabili della formazione precoce di cellule schiumose, della progressione della placca ateromatosa ed, infine della sua rottura [39][40].

Poiché è stato dimostrato che il 7-KC causa primariamente in queste cellule un importante sbilancio redox con produzione massiva di specie reattive di ossigeno e deplezione di GSH, l'azione di molecole antiossidanti potrebbe efficacemente contrastare la sua citotossicità. I risultati del mio lavoro dimostrano che il fitochimico antiossidante indicaxantina è in grado di inibire in maniera tempo e dose dipendente l'effetto antiproliferativo e l'incremento della mortalità cellulare dei THP1-macrofagi indotta da 7-KC a concentrazione riscontrata nella placca ateromatosa umana. E' di grande interesse precisare che le concentrazioni alle quali indicaxantina produce tale effetto sono comprese nel range delle concentrazioni ematiche che la molecola raggiunge nell'uomo dopo ingestione di 500 g di polpa di fico d'India. I risultati ottenuti acquistano quindi importanza di carattere fisiologico.

Il mio studio ha dimostrato che il fitochimico è in grado di inibire il blocco in fase G0/G1 delle cellule, il flippaggio della fosfatidilserina di membrana e la dissipazione del potenziale di membrana mitocondriale indotto da 7-KC in monociti-macrofagi umani. Nel loro complesso questi risultati indicano un chiaro effetto anti-apoptotico di indicaxantina che coinvolge la protezione del mitocondrio [41].

Come precedentemente esposto lo stato redox intracellulare è coinvolto nella regolazione di svariate funzioni cellulari, con ROS considerati secondi messaggeri di trasduzione dell'effetto citotossico di 7-KC. In questo studio ho messo in evidenza che l'indicaxantina è in grado di contrastare l'incremento delle specie reattive dell'ossigeno indotto da 7-KC e di esercitare un effetto di protezione sul contenuto dei tioli totali intracellulari. Studi recenti hanno messo in evidenza una stretta relazione tra livelli di calcio, produzione di ROS e seguente apoptosi in monociti umani trattati con 7-KC. I dati dimostrano che indicaxantina previene il flusso di  $\text{Ca}^{+2}$  all'interno della cellula promosso dall'ossisterolo, inibendo

efficacemente i consequenziali eventi apoptotici. Lo schema 1, appendice 2 mostra un quadro sinottico dell'azione dell'indicaxantina sul nostro modello sperimentale costituito da THP1-macrofagi trattati con 7-KC.

Lavori successivi possono essere pianificati allo scopo di valutare il meccanismo dell'azione protettivo di indicaxantina. Un ipotesi ragionevole consiste nel considerare la possibilità che il fitochimico, interagendo con il bilayer fosfolipidico della membrana plasmatica, possa variarne la fluidità influenzando l'interazione tra il 7-KC e complessi lipoproteici noti come raft lipidici. Questa ipotesi è sostenuta da studi precedenti che dimostrano che il fitochimico può ripartirsi in modelli biomimetici di membrana a livello dell'interfaccia tra le teste polari dei fosfolipidi e lo strato lipidico di membrana.

In conclusione, l'indicaxantina, così come l'integrazione del frutto di fico d'India nella dieta, potrebbe quindi risultare di particolare importanza nella prevenzione di patologie infiammatorie come l'aterosclerosi in cui danno ossidativo alla parete endoteliale causato da prodotti ossidati di colesterolo è oggi ritenuto importante nella promozione della lesione ateromatosa. I nostri risultati suggeriscono di poter considerare l'indicaxantina come nutraceutico naturale con effetti anti-aterogenetici.

## APPENDICE 1

### Prodotti utilizzati

#### **TRYPAN BLUE SOLUTION (0,4%)**

(*Sigma, T-8154*) Lot. 18H2367

(*Conservato su banco a T.A*)

#### **DF**

#### **5-(and-6)-chloromethyl-2',7-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester**

(*Invitrogen, C6827*) Lot. 32416W

MW: 577,80

(*Conservato a -20°C liofilizzata*)

#### **EDTA**

#### **Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate**

(*Sigma, ED 4SS-100G*)

FW: 416,2

C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>Na<sub>4</sub>O<sub>8</sub> \* 2H<sub>2</sub>O

(*Conservato su banco a T.A*)

#### **PBS**

#### **Phosphate Buffer Saline**

(*Sigma, P4417-100 AB*)

(*Conservato su banco a T.A*)

#### **DMEN 1X**

(*Invitrogen, 41966*) Lot. 368195

(+) 4,5 g/L Glucose

(+) L-Glutamine

(+) Pyruvate

(*Conservato a 4°C*)

#### **GENTAMICIN SOLUTION (10 ml)**

(*Sigma, G1397*) Lot. 1108008

(*Conservato a 2-8°C*)

#### **MEM- NON ESSENTIAL AMINO ACID SOLUTION 100X**

(*Sigma, M7145*) Lot. 108K2388

(*Conservato a 2-8°C*)

#### **HEAT INACTIVATED FBS (500 ml)**

(*Invitrogen, 10500-064*) Lot. 07G2790K

(*Conservato a 5 (-20)°C*)

#### **CHOLESTEROL**

(*Sigma, C8667-1G*) Lot. 010M5303

C<sub>27</sub>H<sub>46</sub>O

d: 1,067 g/mL

(*Conservato a -20°C*)

#### **THF**

#### **Tetrahydrofuran**

**(BDH, 152476C)** Lot. 1940123021  
Density (d 20°C/4°C)  
FW: 72,11  
C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O  
(Conservato su banco a T.A)

**DMSO**  
**Dimethyl Sulphoxide**  
(Sigma, D2650) Lot. 115K2308  
FW: 78,13  
C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS  
(Conservato su banco a T.A)

**RNase A**  
(Sigma, R4875) CAS. 9001-99-4  
(Conservato a -20°C liofilizzata)

**PROPIDIO di IODURO**  
(Sigma, P4170) CAS. 25535-16-4  
MW: 668.39  
C<sub>27</sub>H<sub>34</sub>I<sub>2</sub>N<sub>4</sub>  
(Conservato a 4°C)

**TRITON X-100** (500 ml)  
(Sigma, T8532) Lot. 015K0039  
Density 1.07  
(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)<sub>n</sub>C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>O  
(Conservato su banco a T.A)

**RMPI 1640 (500ml)**  
(Invitrogen, 01551) Lot. 712380  
(+) L-Glutamine  
(+) 25mM HEPES  
(Conservato 4°C)

**COULTER ISOTON III Diluent**  
(Beckman Coulter, Inc., 8448044) Lot. 71892  
(Conservato a T.A)

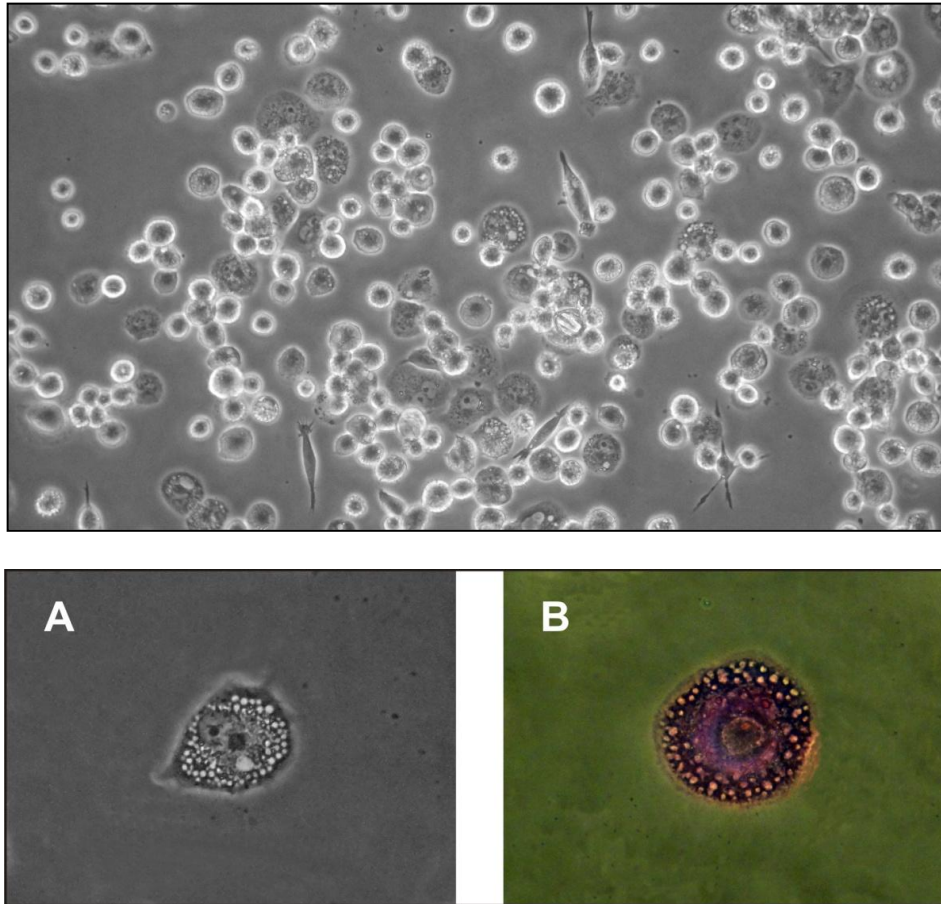
**Fluo 3AM**  
(Santa Cruz Biotechnology, sc-202612) Lot. K1009  
(Conservato -20°C)

**7KETO 100mg**  
**5cholesten3β-d-7one** (minimum 90%)  
(Sigma, C2394) Lot. 050M1166  
(Conservare a -20°C)

**GIEMSA**  
(Bio Optica, o5M12005) Lot. 110610  
(Conservato su banco a T.A)

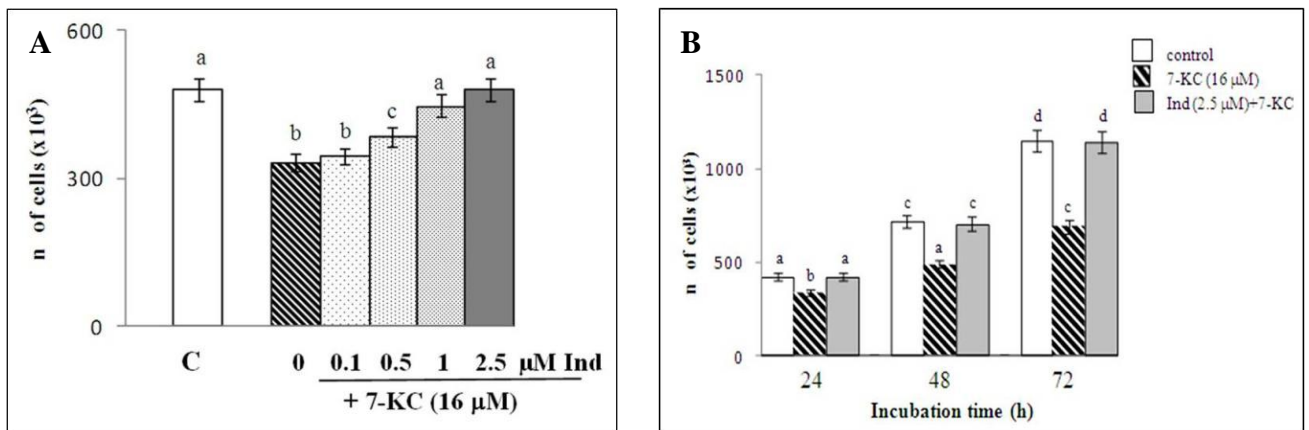
## APPENDICE 2

**Fig.1. THP1-macrofagi in coltura.**



THP1-macrofagi in coltura. (A) Particolare THP1-macrofagi in coltura-microscopia a contrasto di fase; (B) Particolare THP1-macrofagi colorati con Giemsa.

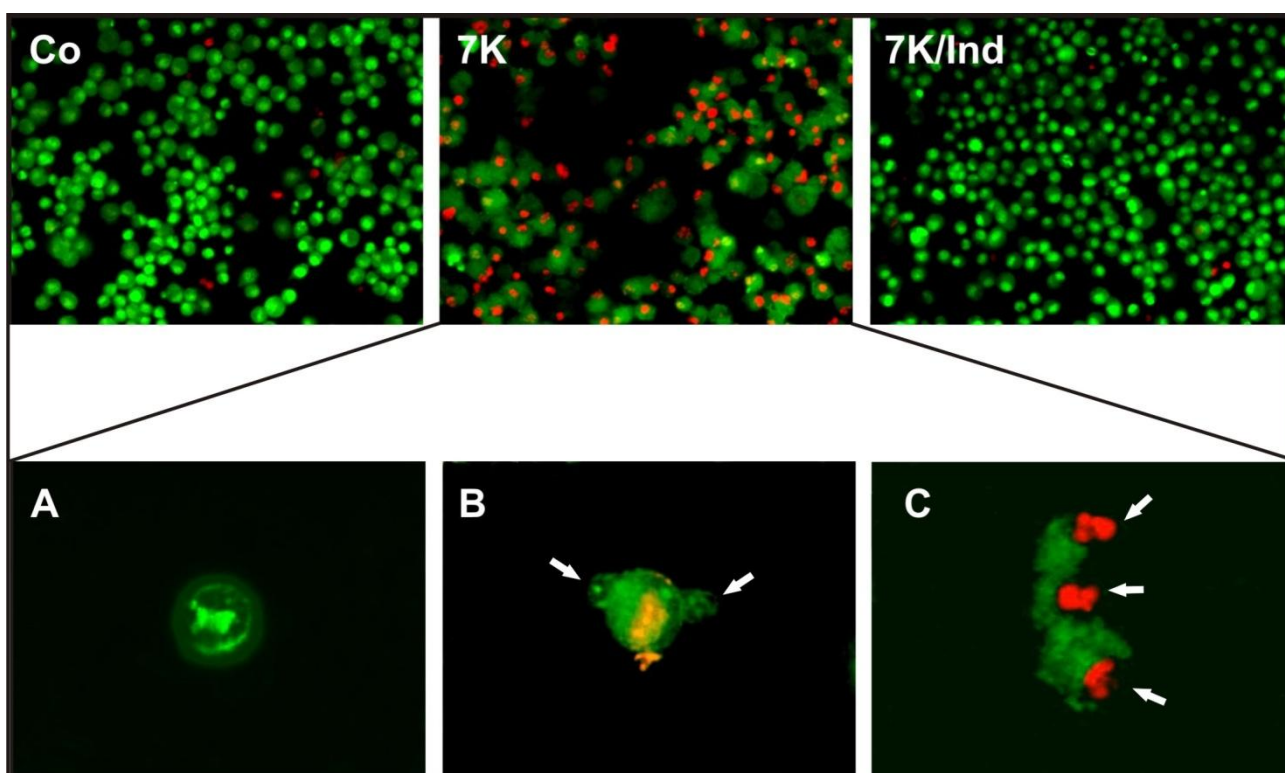
**Fig.2. Effetto di indicaxantina sulla citotossicità indotta dal 7-KC in THP1-macrofagi.**



(A) Effetto dose-dipendente di Ind 0,1 – 0,5 – 1 - e 2,5 µM in presenza di 7-KC (16 µM) dopo 24 ore di incubazione; (B) Effetto tempo-dipendente di Ind 2.5 µM co-incubata con 7-KC (16 µM). I valori che non presentano la stessa lettera sono significativamente differenti ( $P < 0.05$ , Fisher's test). I risultati sono la media  $\pm$  SD di tre esperimenti indipendenti condotti in triplicato.



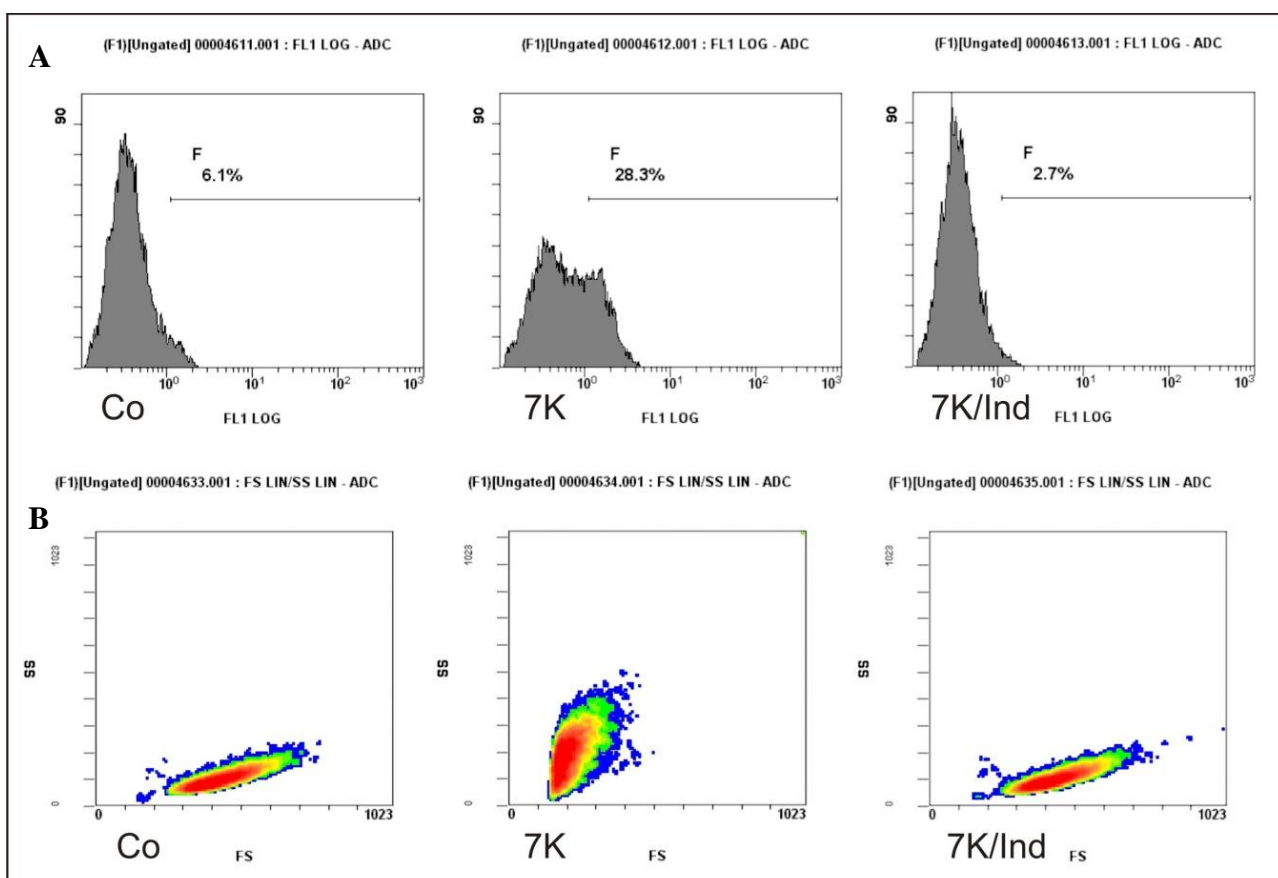
**Fig.3. Effetto protettivo di indicaxantina sulle variazioni morfologiche indotte da 7-KC in cellule THP1.**



**Analisi al microscopio a fluorescenza di THP1-macrofagi trattati per 24 ore con 7-KC in assenza o in presenza di Ind e sottoposte a colorazione con AO/EB.**

Condizione di trattamento e incubazione delle cellule, così come acquisizione delle immagini al microscopio a fluorescenza e successiva elaborazione fu come riportato in metodi. In alto, Co, controllo; 7K, trattato con 7-KC 16  $\mu$ M; 7K/Ind, co-incubato con 7-KC 16 $\mu$ M e Ind 2,5  $\mu$ M; ingrandimento 200x; in basso particolare del trattamento con 7-KC, ingrandimento 400x. In campo A, cellule vive ma con nuclei apoptotici che appaiono colorate in verde, con addensamenti cromatinici di un colore verde brillante; in campo B, le frecce indicano blebbing di membrana; in campo C, le frecce indicano addensamenti cromatinici di colore rosso brillante e corpi apoptotici.

**Fig.4. Effetto protettivo di indicaxantina sull'apoptosi indotta da 7-KC in cellule THP1.**



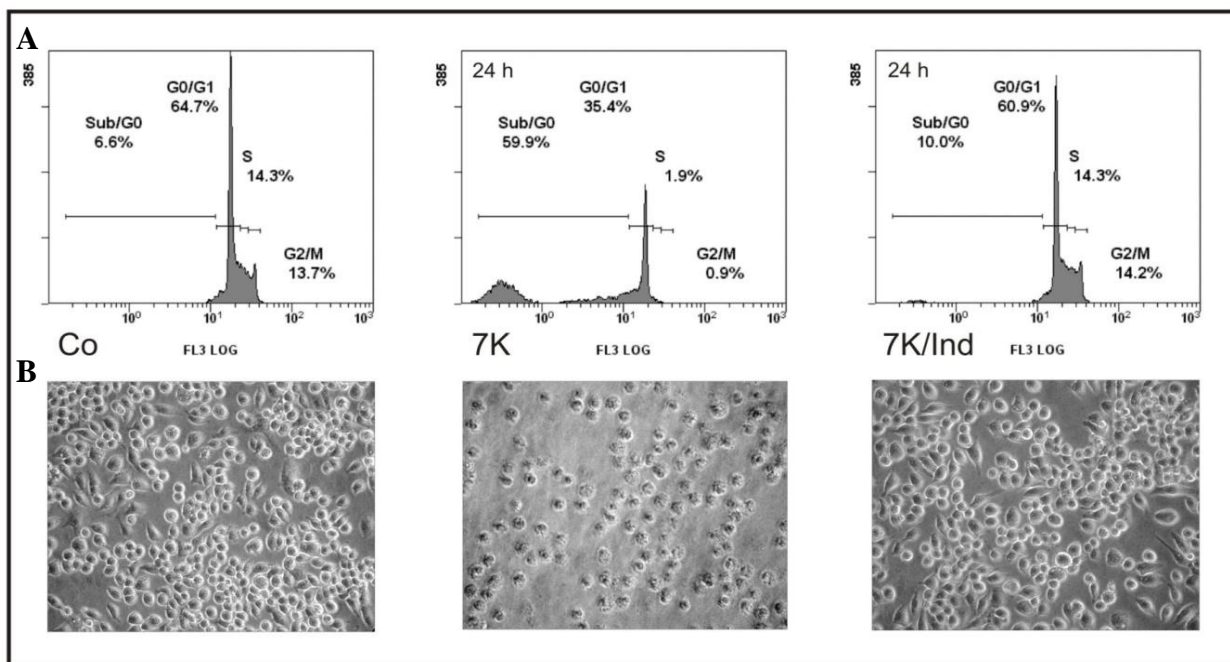
**A. Azione pro-apoptotica del 7-KC su THP1-macrofagi ed effetti protettivi dell'Ind.**

THP1-macrofagi trattati con 7-KC in assenza o in presenza di Ind per 12 ore, marcate poi con Annessina V-FITC. L'Annessina V-FITC identifica l'esposizione della fosfatidilserina lungo l'asse x, identificando le cellule apoptotiche. L'immagine è rappresentativa di un esperimento condotto tre volte in triplicato.

**B. Citogrammi di cellule THP1-macrofagi in apoptosi precoce con 7-KC ed effetto citoprotettivo dell'Ind.**

Assetto citologico di cellule trattate con 7-KC in assenza o in presenza di Ind per 12 ore secondo i parametri FS e SS. Co, controllo; 7K, trattato con 7-KC 16  $\mu$ M; 7K/Ind, co-incubato con 7-KC 16 $\mu$ M e Ind 2,5  $\mu$ M.

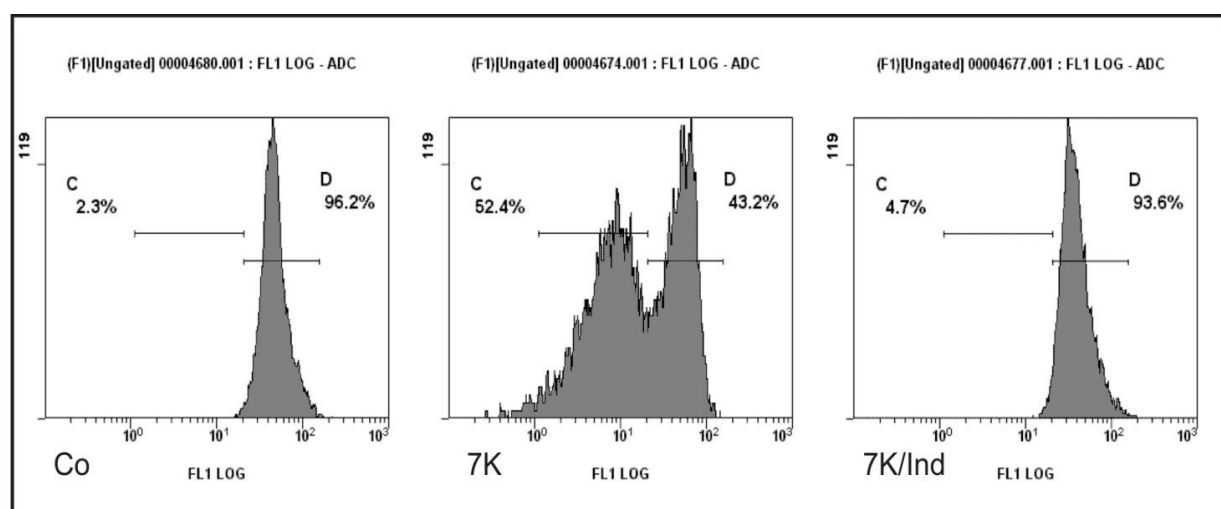
**Fig.5. Effetto di indicaxantina sulla variazione della dinamica del ciclo cellulare indotta da 7-KC in cellule THP1.**



**Istogrammi citofluorimetrici del ciclo cellulare (A) ed immagini al microscopio a contrasto di fase (B) di THP1-macrofagi dopo 24 ore di trattamento con 7-KC e azione protettiva di Ind.**

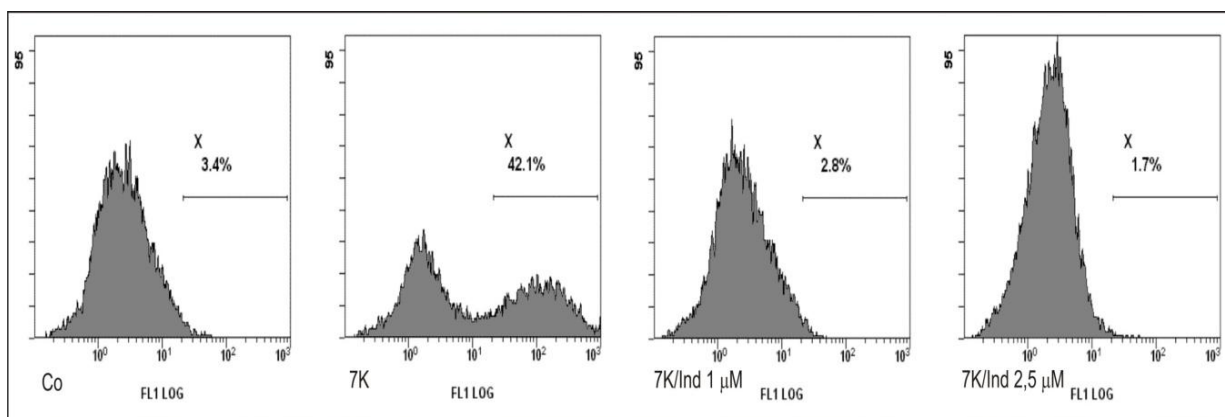
Condizione di incubazione delle cellule con 7-KC in assenza o in presenza e Ind e successivo trattamento con ioduro di propidio ed analisi citofluorimetrica, fu come riportato in metodi. **B**, ingrandimento 200x. L'immagine è rappresentativa di un esperimento condotto tre volte in triplicato. Co, controllo; 7K, trattato con 7-KC 16  $\mu$ M; 7K/Ind, co-incubato con 7-KC 16 $\mu$ M e Ind 2,5  $\mu$ M.

**Fig.6. Influenza del 7-KC sul  $\Delta\psi_m$  mitocondriale in THP1-macrofagi ed effetto di indicaxantina.**



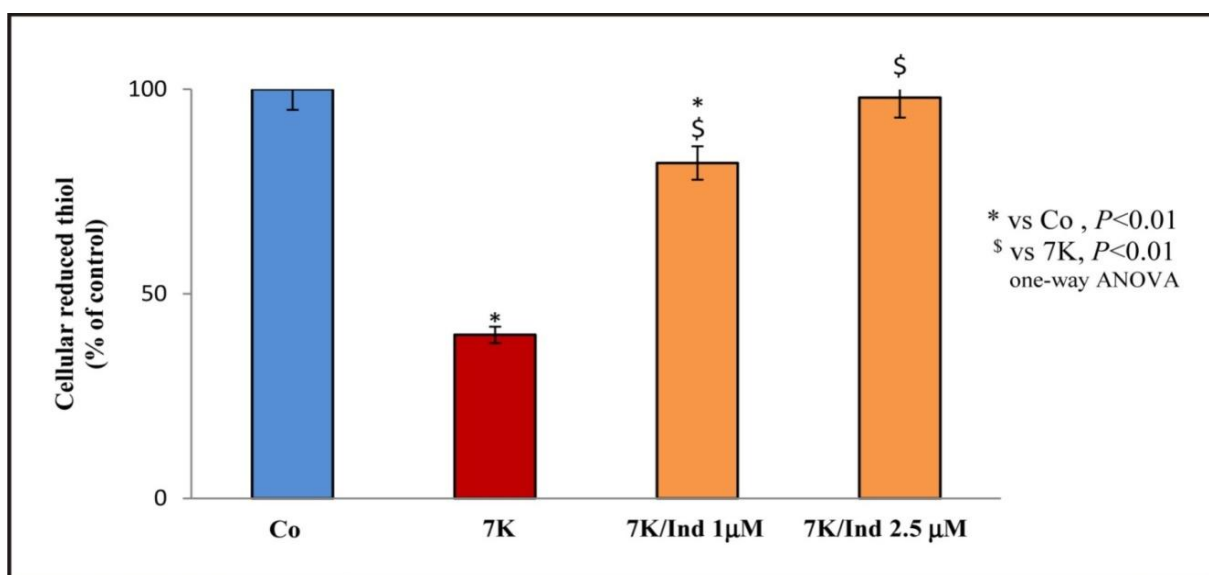
**Variazione del potenziale di membrana mitocondriale indotta da 7-KC su THP1-macrofagi ed effetto protettivo dell'Ind.** THP1-macrofagi furono trattati con 7-KC in presenza e in assenza di Ind per 16 ore, quindi incubati con DiOC6 come riportato in metodi. L'immagine è rappresentativa di un esperimento condotto tre volte in triplicato. Co, controllo; 7K, trattato con 7-KC 16  $\mu$ M; 7K/Ind, co-incubato con 7-KC 16 $\mu$ M e Ind 2,5  $\mu$ M.

**Fig.7. Produzione di ROS intracellulari indotta in THP1-macrofagi dopo 1 ora di trattamento con 7-KC ed effetto antiossidante di indicaxantina.**



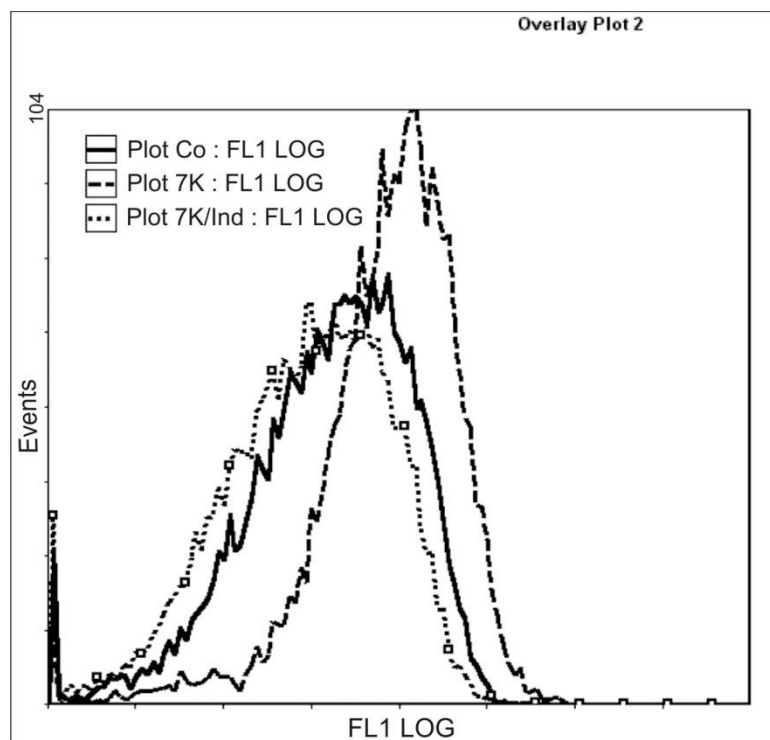
THP1-macrofagi furono trattati con 7-KC in presenza e in assenza di Ind per 1 ora, quindi incubati con DCFH-DA come riportato in metodi. L'immagine è rappresentativa di un esperimento condotto tre volte in triplicato. Co, controllo; 7K, trattato con 7-KC 16 μM; 7K/Ind, co-incubato con 7-KC 16μM e Ind 1-2,5 μM.

**Fig.8. Riduzione dei tioli intracellulari in THP1-macrofagi dopo 1 ora di trattamento con 7-KC ed effetto antiossidante di indicaxantina.**



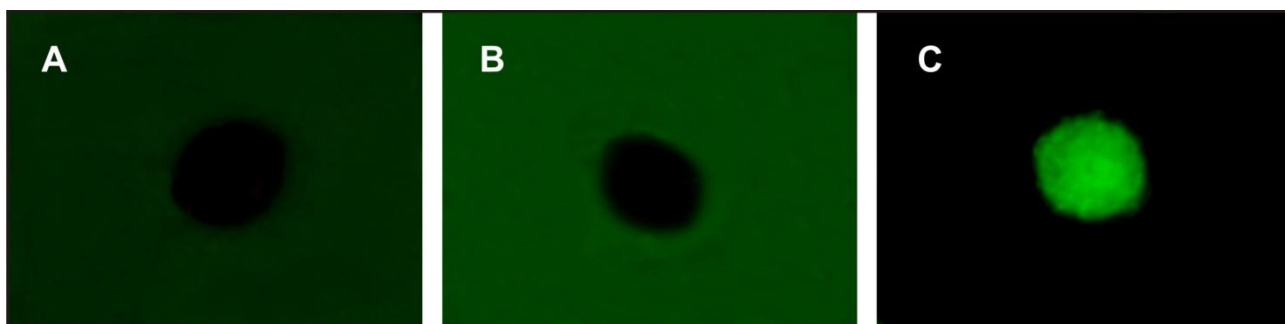
THP1-macrofagi furono trattati con 7-KC in presenza e in assenza di Ind per 1 ora, e i livelli dei tioli furono valutati spettrofotometricamente come riportato in metodi. I dati sono la media  $\pm$  SD di tre separati esperimenti condotti in triplicato. Co, controllo; 7K, trattato con 7-KC 16 μM; 7K/Ind, co-incubato con 7-KC 16μM e Ind 1-2,5 μM.

**Fig.9. Incremento di  $Ca^{+2}$  intracellulare indotto da 7-KC in THP1-macrofagi ed effetto di indicaxantina.**



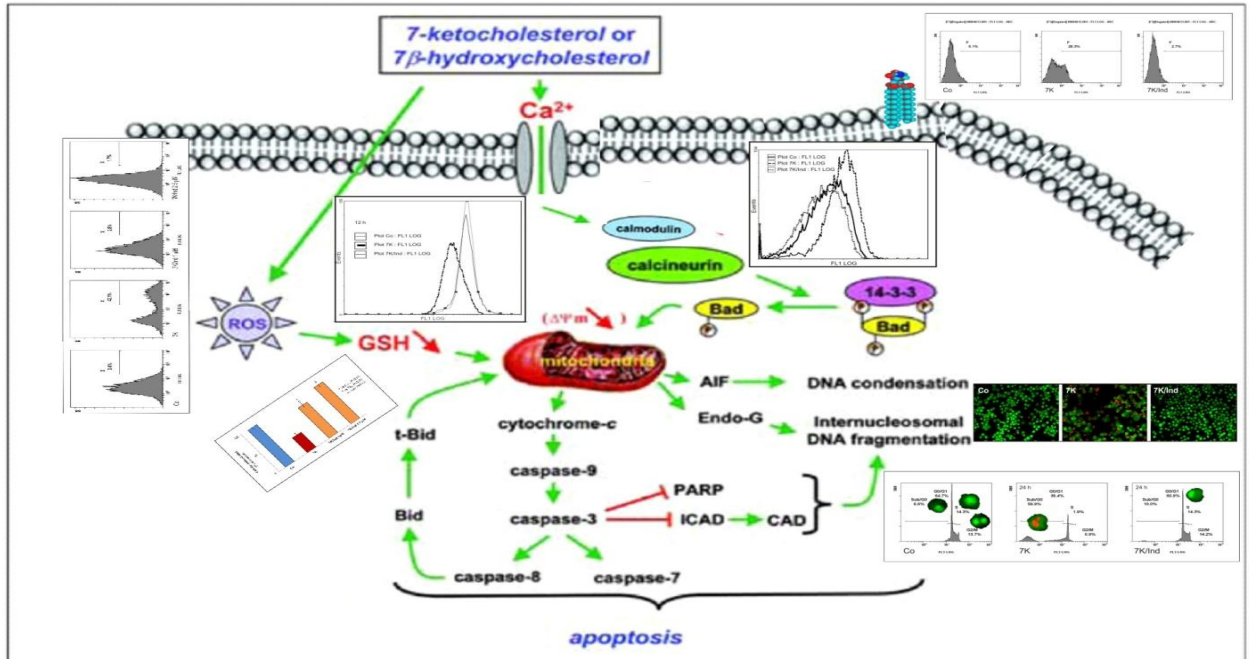
Istogramma relativo all'intensità di fluorescenza per Fluo-3AM in cellule THP1-macrofagi esposte a 7-KC ed azione dell'Ind. THP1-macrofagi furono trattati con 7-KC in assenza o in presenza di Ind per 3 ore ed analizzate mediante citofluorimetria. L'immagine è rappresentativa di un esperimento condotto tre volte in triplicato. Co, controllo; 7K, trattato con 7-KC 16  $\mu$ M; 7K/Ind, co-incubato con 7-KC 16 $\mu$ M e Ind 2,5  $\mu$ M.

**Fig.10. Permeazione di indicaxantina in THP1-macrofagi.**



Analisi al microscopio a fluorescenza di THP1-macrofagi incubati con indicaxantina e sottoposti a colorazione con EB. Condizione di trattamento e incubazione delle cellule, così come acquisizione delle immagini al microscopio a fluorescenza e successiva elaborazione fu come riportato in metodi. (A) Cellula controllo; (B) Cellula dopo 10 minuti di incubazione con Ind 100  $\mu$ M; (C) Cellula dopo 20 minuti di incubazione con Ind 100  $\mu$ M.

**Schema 1. Quadro sinottico dell'azione dell'indicaxantina su THP1-macrofagi trattati con 7-KC**



## BIBLIOGRAFIA

- [1] Tesoriere L. et al. Kinetics of the lipoperoxyl radical- scavenging activity of indicaxanthin in solution and unilamellar liposomes. *Free Rad. Res* 2007;41:226-233.
- [2] Gentile C et al. Antioxidant betalains from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) inhibit endothelial ICAM-1 expression. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1028:481-6.
- [3] Allegra M et al. Inhibition of the TCR-mediated activation of naive murine T cells by Cactus Pear Fruit extracts. *Life Science* 2007. Glasgow 8-12-July 2007.
- [4] Tesoriere L et al. In vitro digestion of betalainic foods. Stability and bioaccessibility of betaxanthins and betacyanins and antioxidative potential of food digesta. *J Agric Food Chem*. 2008;56:10487-92.
- [5] Butera D et al. Antioxidant activities of sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: betanin and indicaxanthin. *J Agric Food Chem* 2002;50:6895-901.
- [6] Tesoriere L et al. Cytoprotective effects of the antioxidant phytochemical indicaxanthin in beta-thalassemia red blood cells. *Free Radic Res* 2006;40:753-61.
- [7] Tesoriere L et al. Distribution of betalain pigments in red blood cells after consumption of cactus pear fruits and increased resistance of the cells to ex vivo induced oxidative hemolysis in humans. *J Agric Food Chem* 2005;53:1266-70.
- [8] Tesoriere L Absorption, excretion, and distribution in low density lipoproteins of dietary antioxidant betalains. Potential health effects of betalains in humans. *American Journal of Clinical Nutrition* 2004; 80: 941-945.
- [9] Allegra M, et al. Betanin inhibits the myeloperoxidase/nitrite-induced oxidation of human low-density lipoproteins. *Free Radic Res* 2007;41:335-41.
- [10] Gerry AB, Satchell L, Leake DS. A novel method for production of lipid hydroperoxide- or oxysterol-rich low-density lipoprotein. *Atherosclerosis* 2008;197:579-87.
- [11] Dzeletovic S, Babiker A, Lund E, Diczfalusy U. Time course of oxysterol formation during in vitro oxidation of low density lipoprotein. *Chem Phys Lipids* 1995;17:119-28.
- [12] Libby, P. Inflammatory mechanism : the molecular basis of inflammation and disease. *Nutr.Rev.* 2007; 65, S 140-6.
- [13] Brown, A.J.; Jessup, W. Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 1999; 142, 1-28.
- [14] Guardiola, F.; Dutta, P.C.; Codony, R.; Savaga, G.P. Cholesterol and Phytosterol Oxidation Products: Analysis, Occurrence and Biological Effects. *AOCS: Champaign, IL*, 2002.
- [15] L.L.Smith, B.H. Johnson, Biological activities of oxysterols, *Free Radic. Biol. Med.* 7, 1989; 285-332.
- [16] Ong JM, Aoki AM, Seigel GM, Sacerio I, Castellon R, Nesburn AB, Kenney MC Oxysterol-induced toxicity in R28 and ARPE-19 cells. *Neurochem Res* 2003; 28:883-891.

- [17] Moreira EF, Larrayoz IM, Lee JW, Rodríguez IR 7-Ketocholesterol is present in lipid deposits in the primate retina: potential implication in the induction of VEGF and CNV formation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50:523–532.
- [18] Boissonneault G.A., Hennig B., Ouyang C.-M, Oxysterols, cholesterol biosynthesis, and vascular endothelial cell monolayer barrier function, *Proc Soc Exp Biol Med* 1991; 338–343.
- [19] Leonarduzzi G., Sottero B., Poli G., Oxidized products of cholesterol: dietary and metabolic origin, and proatherosclerotic effects (review), *Journal of Nutritional Biochemistry* 2002; 700–710.
- [20] Lemaire-Ewing S., Prunet C., Montange T., Vejux A., Berthier A., Bessede G., et al. Comparison of the cytotoxicity, pro-oxidant and pro-inflammatory characteristics of different oxysterols. *Cell Biol Toxicol* 2005; 21: 97-114.
- [21] Rodríguez IR, Alam S, Lee JW Cytotoxicity of oxidized low-density lipoprotein in cultured RPE cells is dependent on the formation of 7-ketocholesterol. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45:2830–2837.
- [22] Palozza P, Serini S, Verdecchia S, Ameruso M, Trombino S, Picci N, et al. Redox regulation of 7 ketocholesterol-induced apoptosis by  $\beta$ -carotene in human macrophages. *Free Radic Biol Med* 2007; 42:1579–90.
- [23] Palozza, P.; Serini, S.; Verdecchia, S.; Ameruso, M.; Trombino, S.; Picci, N.; Moneto, G.; Ranelletti, F.O. Redox regulation of 7-ketocholesterol-induced apoptosis by  $\beta$ -carotene in human macrophages. *Free Radic. Biol. Med.*, 2007; 42, 1579-90.
- [24] Yudkin JS, Kumari M, Humphries SE, Mohamad-Ali V: Inflammation. Obesity, stress and coronary heart disease: Is interleukin-6 the link *Atherosclerosis* 2000; 148: 209–214.
- [25] Rhee SH, Jones BW, Toshchakov V, Vogel SN, Fenton MJ. Toll-like receptors 2 and 4 activate STAT1 serine phosphorylation by distinct mechanisms in macrophages. *J Biol Chem* 2003; 278:22506–12.
- [26] Schreck R., Rieber P., Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- $\kappa$ B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.*,1991; 10, 2247-8.
- [27] Lemaire-Ewing S, Prunet C, Montange T, Vejux A, Berthier A, Bessede G, et al. Comparison of the cytotoxic, prooxidant and pro-inflammatory characteristics of different oxysterols. *Cell Biol Toxicol* 2005; 21: 97-114.
- [28] Pedruzzi, E.; Guichard, C.; Ollivier, V.; Driss, F.; Fay, M.; Prunet, C.; Marie, J.-C.; Pouzet, C.; Samadi, M.; Elbim, C.; O'dowd, Y.; Bens, M.; Vandewalle, A.; Gougerot-Pocidalo, M.A.; Lizard, G.; Ogier-Denis, E. NAD(P)H oxidase Nox-4 mediates 7-ketocholesterol-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *Mol. Cell. Biol.*, 2004; 24, 10703-17.



- [29] Hayden JM, Brachova L, Higgins K, Obermiller L, Sevanian A, Khandrika S, et al. Induction of monocyte differentiation and foam cell formation in vitro by 7-ketocholesterol. *J Lipid Res* 2002; 43: 26-35.
- [30] Liu Y, Ge M, Ciani L, Kuriakose G, Westover EJ, Dura M, et al. Enrichment of endoplasmic reticulum with cholesterol inhibits sarcoplasmic-endoplasmic reticulum calcium ATPase-2b activity in parallel with increased order of membrane lipids: implications for depletion of endoplasmic reticulum calcium stores and apoptosis in cholesterol-loaded macrophages. *J Biol Chem* 2004; 279:37030–9.
- [31] Lizard, G., Lemaire, S., Monier, S., Gueldry, S., Néel, D., and Gambert, P. Induction of apoptosis and of interleukin-1 $\beta$  secretion by 7 $\beta$ -hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol: partial inhibition by Bcl-2 overexpression. *FEBS Lett.* 1997; 419, 276–280.
- [32] Lizard, G., Gueldry, S., Sordet, O., Monier, S., Athias, A., Miguet, C., Bessede, G., Lemaire, S., Solary, E., Gambert, P. Glutathione is implied in the control of 7 ketocholesterol-induced apoptosis, which is associated with radical oxygen species production. *FASEB J.* 1998;12, 1651–1663.
- [33] Lizard, G.; Miguet, C.; Bessede, G.; Monier, S.; Gueldry, S.; Néel, D.; Gambert, P. Impairment with various antioxidants of the loss of mitochondrial transmembrane potential and of the cytosolic release of cytochrome c occurring during 7-ketocholesterol-induced apoptosis. *Free Radic. Boil. Med.* 2000; 28:743–753.
- [34] Ghibelli, L., Fanelli, C., Rotilio, G., Lafavia, E., Coppola, S., Colussi, C., Civitareale, P., and Ciriolo, M. R. Rescue of cells from apoptosis by inhibition of active GSH extrusion. *FASEB J.* 1998;12, 479–486.
- [35] Mackrill J.J. Oxysterols and calcium signal transduction. *Chem. Phys. Lipids.* 2011 epub.
- [36] Lemaire S, Lizard G, Monier S, Miguet C, Gueldry S, Volot F, Gambert P, Néel D. Different patterns of IL-1 $\beta$  secretion, adhesion molecule expression and apoptosis induction in human endothelial cells treated with 7 $\alpha$ -, 7 $\beta$ -hydroxycholesterol, or 7-ketocholesterol. *FEBS Lett* 1998;440:434–9.
- [37] Van Reyk DM, Brown AJ, Hultén LM, Dean RT, Jessup W. Oxysterols in biological systems: sources, metabolism and pathophysiological relevance. *Redox Rep* 2006;11:255–62 Review.
- [38] Yasunobu Y, Hayashi K, Shingu T, Yamagata T, Kajiyama G, Kambe M. Coronary atherosclerosis and oxidative stress as reflected by autoantibodies against oxidized low-density lipoprotein and oxysterols. *Atherosclerosis* 2001;155:445–53.
- [39] Lizard, G.; Monier, S.; Cordelet, C.; Gesquiere, L.; Deckert, V.; Gueldry, S.; Lagrost, L.; Gambert, P. Characterization and comparison of the mode of cell death, apoptosis versus necrosis, induced by 7 $\beta$ -hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol in the cells of the vascular wall. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1999; 19:1190–1200.
- [40] Miguet, C.; Monier, S.; Bettaieb, A.; Athias, A.; Bessede, G.; Laubriet, A.; Lemaire, S.; Néel, D.; Gambert, P. Lizard, G. Ceramide generation

occurring during 7- $\beta$ -hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol-induced apoptosis is caspase independent and is not required to trigger cell death. *Cell Death Differ.* 200;18:83–99.

[41] Huang Z., Liu Q., Li W., Wang D., Wang Y., Zhang F., Zhang Y., Chi Z., Liu E., Matsuura Z., Liu and Zhang Q. 7-Ketocholesterol Induces Cell Apoptosis by Activation of Nuclear Factor kappa B in Mouse Macrophages, *Acta Med. Okayama*, 2010; Vol. 64, No. 2, pp. 85-93.