



**UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E  
DELL'AMBIENTE**

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Molecolare e Applicata

**Paraoxonasi-2 come potenziale marker del fotodanno  
cutaneo**

*Paraoxonase-2 as a potential marker of skin  
photodamage*

Tesi di laurea magistrale di:  
Gioia Pichilli

Relatore:  
Chiar.ma Prof.ssa Tiziana Bacchetti

Correlatore:  
Chiar.ma Prof.ssa Elisabetta Damiani

Sessione di Luglio 2021  
A.A. 2020/2021



# Sommario

<b>SCOPO DELLA TESI .....</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUZIONE.....</b>	<b>7</b>
1. LA PELLE E IL FOTO-DANNO.....	7
1.1 LA COMPOSIZIONE DEGLI STRATI DELLA PELLE .....	7
1.1.1 L'epidermide.....	8
1.1.2 Il derma .....	12
1.1.3 L'ipoderma.....	14
1.2 LE RADIAZIONI SOLARI E LA LORO COMPOSIZIONE.....	15
1.3 GLI EFFETTI DELL'ESPOSIZIONE AI RAGGI ULTRAVIOLETTI .....	18
1.3.1 Le radiazioni UVA e i loro effetti biologici.....	18
1.3.2 Le radiazioni UVB e i loro effetti biologici.....	19
1.3.3 Le radiazioni UVC e i loro effetti biologici.....	20
1.3.4 Gli effetti delle radiazioni UV sulla cute.....	21
1.3.5 Effetti positivi delle radiazioni UV.....	22
1.3.6 La produzione di Vitamina D .....	23
1.3.7 La produzione di serotonina .....	23
1.3.8 L'abbronzatura .....	23
1.3.9 Gli effetti negativi delle radiazioni UV.....	24
1.3.10 L'eritema solare.....	24
1.3.11 La fotocarcinogenesi .....	25
1.3.12 I danni oculari.....	28
1.3.13 Il Fotoinvecchiamento .....	29
2. STRESS OSSIDATIVO E RUOLO DEGLI ANTIOSSIDANTI.....	32
2.1 Gli antiossidanti.....	37
3. CARATTERISTICHE STRUTTURALI E FUNZIONALI DELL'ENZIMA PARAOXONASI 2 .....	41
3.1 La famiglia delle Paraoxonasi.....	41
3.2 Espressione della PON2 .....	44
3.3 PON2: una proteina altamente espressa.....	45
3.4 Caratteristiche strutturali di PON2 .....	48
3.5 Substrati di PON2 .....	52
3.6 Azione antiossidante e antinfiammatoria di PON2 .....	54
3.7 Meccanismi molecolari alla base del ruolo protettivo di PON2 contro lo stress ossidativo .....	57
3.8 Il ruolo anti apoptotico.....	60
3.9 PON2 nelle patologie tumorali .....	63

3.10 <i>Modulazione dell'espressione e dell'attività di PON2</i> .....	66
3.11 <i>Fattori genetici</i> .....	71
<b>MATERIALI E METODI</b> .....	<b>72</b>
4.1 MATERIALI.....	72
4.2 METODI .....	72
4.2.1 <i>Modello cellulare utilizzato</i> .....	72
4.2.2 <i>Irraggiamento con lampada solare UVA</i> .....	76
4.2.3 <i>Estratto proteico totale e quantificazione proteica mediante metodo BCA</i> .....	77
4.2.4 <i>Analisi dell'espressione proteica mediante Western Blot</i> .....	78
4.2.5 <i>Analisi della vitalità cellulare e dei livelli intracellulari dei ROS</i> .....	79
4.3 ANALISI STATISTICA DEI RISULTATI.....	81
<b>RISULTATI</b> .....	<b>82</b>
5.1 EFFETTO DELL'ESPOSIZIONE A RAGGI UVA SULL' ESPRESSIONE DELL'ENZIMA PON2 IN FIBROBLASTI DERMICI.....	82
5.2 EFFETTO DELL'ESPOSIZIONE A RAGGI UVA SULLA VITALITÀ CELLULARE E SULLA PRODUZIONE INTRACELLULARE DI ROS E AGES IN CELLULE HDF A DIVERSI TIME POINT POST-IRRAGGIAMENTO.....	84
5.3 L'EFFETTO DELL'ESPOSIZIONE A RAGGI UVA IN CELLULE HDF: ANALISI DELL'ESPRESSIONE DI PON2 A DIVERSI TIME POINT POST-IRRAGGIAMENTO.....	90
5.4 L'EFFETTO DELLA CREMA SOLARE SULL'ESPOSIZIONE A RAGGI UVA IN CELLULE HUDE: ANALISI DELLA CITOTOSSICITÀ E ESPRESSIONE DI PON2 .....	93
<b>CONCLUSIONI</b> .....	<b>99</b>
<b>RIFERIMENTI</b> .....	<b>104</b>

## SCOPO DELLA TESI

Il sole emette diversi tipi di radiazioni appartenenti allo spettro elettromagnetico, il quale è suddiviso in diverse regioni: gli ultravioletti, lo spettro del visibile e gli infrarossi. La componente ultravioletta è un importante fattore naturale che presenta numerosi effetti benefici sulla salute dell'uomo tra cui attività disinfettante, proprietà immunoregolatorie, stimolazione della produzione di vitamina D e serotonina. Tuttavia, è noto che i raggi ultravioletti possono esercitare anche un'azione dannosa sulla cute, correlando in maniera diretta l'esposizione alla luce solare e l'insorgenza di tumori cutanei.

A seconda della lunghezza d'onda la radiazione ultravioletta è suddivisa in tre regioni: radiazioni ultraviolette A (UVA) (315-400 nm), radiazioni ultraviolette B (UVB) (280-315 nm) e radiazioni ultraviolette C (UVC) (100-280 nm). Sebbene la radiazione UVC sia quella potenzialmente più dannosa per i sistemi biologici, questa viene tuttavia efficacemente filtrata dallo strato di ozono presente nella stratosfera, di conseguenza le componenti ultraviolette di maggiore interesse nello studio della foto-cancerogenesi sono le radiazioni UVA e UVB. I raggi UVA costituiscono la maggior componente ultravioletta che arriva sulla terra (il 90-95% della radiazione UV totale), penetrano nella cute fino al derma. L'irradiazione UVB raggiunge solo per il 5% la superficie terrestre e nonostante sia in grado di penetrare solo fino allo strato epidermico della cute, risulta comunque estremamente dannosa a causa dell'alta energia che possiede. L'intensa o eccessiva esposizione agli stessi porta a ustioni solari, eritema, infiammazione, iperpigmentazione, rughe, iperplasia, fotoinvecchiamento e fotocarcinogenesi). I raggi UVA e UVB interagiscono con le cellule e agiscono promuovendo la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) che sono in grado di ossidare molteplici componenti cellulari come carboidrati, lipidi, proteine e DNA. I danni indotti a queste

macromolecole biologiche svolgono un importante nei meccanismi molecolari associati alla cancerogenesi.

Le cellule del derma, tuttavia, possiedono vari meccanismi di difesa e di riparo endogeni che concorrono a proteggere il danno ossidativo mediato da UV e a mantenere l'integrità cellulare, tra questi l'enzima paraoxonasi-2 (PON2). PON2 è un membro della famiglia delle Paraoxonasi. È un enzima intracellulare e ubiquitario. Un'ampia letteratura scientifica supporta un ruolo protettivo di PON2 contro lo stress ossidativo e la perossidazione lipidica [1]. Fattori genetici e ambientali sono in grado di influenzare l'espressione e l'attività di PON2.

Diversi studi hanno investigato l'effetto di UVA e UVB sui meccanismi di difesa antiossidante delle cellule del derma, ma nessuno studio, ad oggi, è stato condotto al fine di valutare l'effetto dell'esposizione sulla PON2.

Pertanto, scopo della presente tesi è stato investigare l'effetto dell'esposizione a raggi UVA sull'espressione di PON2 utilizzando fibroblasti di derma umano, come modello cellulare. Le cellule sono state esposte a raggi UVA e stato valutato il foto-danno e la variazione dell'espressione di PON2 in funzione del tempo post-irraggiamento. Il foto-danno è stato quantificato in termini di vitalità cellulare e livelli intracellulari di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Lo studio è stato condotto in presenza di una crema solare contenenti filtri chimici con spf 30.

# INTRODUZIONE

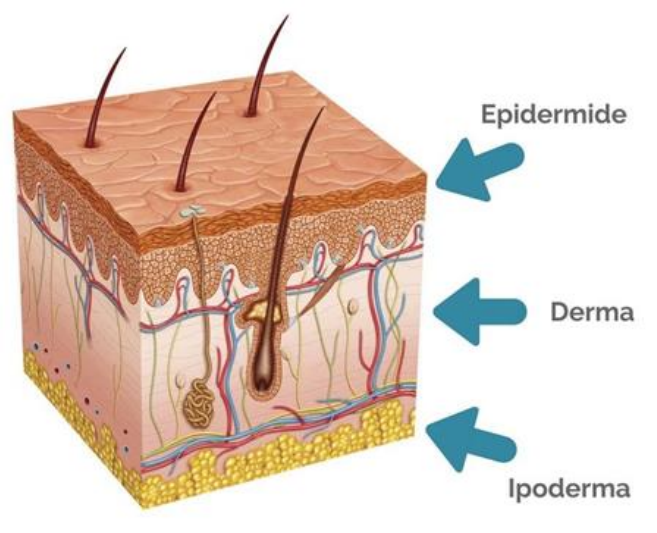
## 1. LA PELLE E IL FOTO-DANNO

### 1.1 LA COMPOSIZIONE DEGLI STRATI DELLA PELLE

La pelle è l'organo più esteso del corpo umano e funge da principale organo protettivo del corpo [2] dal momento che può essere influenzata da diversi disturbi in risposta a fattori esterni. Fornisce una protezione continua contro le sostanze chimiche, le radiazioni e le infezioni e partecipa alla sintesi della vitamina D [3].

È diversa in ogni essere umano in termini di spessore, colore composizione ghiandolare e vascolarizzazione in base alla zona del corpo che ricopre [4].

È composta da tre strati principali denominati, partendo dall'esterno verso l'interno epidermide, derma e ipoderma.



*Figura 1.* Struttura della pelle [5].

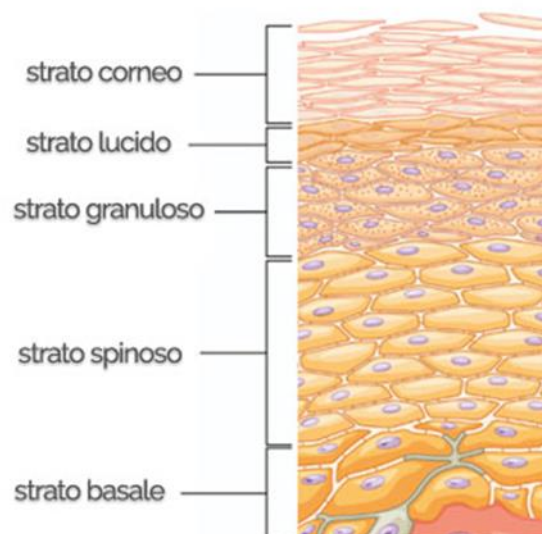
Questi strati sono di origine diversa, l'epidermide è di origine ectodermica, mentre il derma e l'ipoderma sono di origine mesodermica [3].

L'epidermide e il derma sono uniti da uno strato di rilievi connettivali che aumentano l'estensione e facilitano gli scambi, mentre sono separati sia fisicamente che funzionalmente dalla membrana basale, a sua volta costituita da una lamina densa di strutture a microfibrille di collagene, da una lamina lucida attraversata da filamenti di ancoraggio e da glicoproteine che mantengono l'adesione tra cellule [4].

### 1.1.1 L'epidermide

L'epidermide rappresenta lo strato più superficiale della pelle, quello in contatto con l'ambiente esterno. Anatomicamente si tratta di un epitelio pavimentoso pluristratificato e corneificato che si trova sopra una lamina di connettivo denso a fasci intrecciati (derma o corion).

In questo epitelio si trovano diversi tipi di cellule a loro volta organizzate in cinque strati, che partendo dall'interno verso l'esterno sono lo strato basale, lo strato spinoso, lo strato granuloso, lo strato lucido ed infine lo strato corneo.



**Figura 2.** Gli strati che compongono l'epidermide [6].



Più dettagliatamente, lo strato basale è quello più profondo ed è costituito da un singolo strato di cellule che poggiano su una membrana basale, legate ad essa tramite giunzioni ancoranti dette emidesmosomi. Questo strato è detto anche germinativo in quanto qui le cellule sono in continua divisione mitotica e rappresentano lo strato del continuo rinnovamento cutaneo [4].

Queste cellule con la divisione asimmetrica danno origine ai cheratinociti, che all'aumentare del grado di differenziazione migrano verso gli strati più superficiali e sono le cellule che più tipiche dell'epidermide. Nello strato basale troviamo anche i melanociti, cellule parzialmente responsabili del colore della cute, e le cellule recettoriali di Merkel [7].

Lo strato spinoso è costituito da 5-10 file di cellule di forma poliedrica, leggermente appiattite, connesse tra loro dai desmosomi. Viene definito spinoso in quanto composto da cellule di forme irregolari come delle spine, ricche di melanosomi, che sono organelli contenenti melanina prodotta dai melanociti, mentre le più superficiali hanno vacuoli chiamati cheratinosomi il cui numero aumenta poi nello strato granuloso: questi in particolare, contengono delle lamelle lipidiche disposte in modo parallelo che vengono riversate extracellularmente con funzione di impermeabilità all'acqua. Le cellule che compongono questo strato sono le cellule di Langerhans (che non hanno desmosomi) e i cheratinociti che continuano il processo di differenziamento migrando verso gli strati superiori.

Lo strato granuloso sovrastante quello spinoso, è costituito da diversi strati di cheratinociti che sono però di forma più piatta e più differenziati rispetto a quelli dello strato spinoso proprio per la degradazione di alcune componenti cellulari. Le cellule di questo strato nel citoplasma contengono granuli di cheratoialina, la quale interviene nell'assemblaggio della cheratina.

Lo strato lucido è composto da cellule appiattite e traslucide per la presenza di eleidina, una proteina ricca di lipidi e zolfo. Nei cheratinociti si trovano filamenti di cheratina impacchettati e paralleli alla superficie della cute.

Le membrane cellulari in questo strato sono spesse e dunque questo è uno strato presente in zone del corpo dove la pelle è più spessa, come palmo della mano e pianta del piede.

Come ultimo strato, quello più esterno, troviamo lo strato corneo con spessore variabile in base alla sede anatomica, che è composto da cellule morte, cheratinizzate e di forma laminare: le lamelle cornee non contengono né nucleo né organelli ma solo filamenti impacchettati tra loro di cheratina, hanno membrane più spesse e uno spazio intercellulare occupato da lipidi derivanti dai cheratinosomi [8].

Le cellule che formano l'epidermide sono:

-i cheratinociti, i più abbondanti, hanno un ciclo vitale di circa 14 giorni ed hanno forma cubica, con nucleo allungato e citoplasma basofilo. Il nome cheratinociti è legato al fatto che durante il loro differenziamento, detto citomorfosi cornea, vi è un'espressione crescente della cheratina, fatta di lunghe catene amminoacidiche legate da ponti disolfuro che costituiscono una struttura rigida e resistente [9]. I cheratinociti hanno origine nella lamina basale dalle cellule staminali e durante la progressione agli strati superiori, c'è la sintesi dell' $\alpha$ -cheratina, una scleroproteina fibrosa molto resistente, in forma di tonofilamenti. Progredendo verso gli strati epidermici, i tonofilamenti aumentano di numero ed insieme a proteine che derivano dalla trasformazione dei granuli cheratoinalini, costituiscono gran parte del contenuto proteico. In seguito, i cheratinociti vanno incontro ad apoptosi e si trasformano in lamelle di cheratina che origina dalla combinazione di tonofilamenti di  $\alpha$ -cheratina e matrice.

La funzione principale di queste cellule è quella di proteggere l'organismo da agenti esterni quali patogeni e radiazioni ultraviolette (UV):

-le cellule di Merkel sono cellule recettoriali, più piccole dei cheratinociti e si trovano nella zona basale vicino ad aree vascolarizzate ed innervate dal derma, dove si associano alle terminazioni nervose afferenti e partecipano alle funzioni sensoriali della cute [7];

-le cellule di Langerhans sono cellule dendritiche in grado di riconoscere, captare e comunicare la presenza di antigeni. Sono simili ai melanociti a causa della loro morfologia ramificata, ma differiscono da questi a causa dell'assenza di pigmento (e quindi dei granuli di melanina) e dalla presenza dei granuli di Birbeck [10];

-i melanociti si formano dai melanoblasti che derivano, per migrazione durante lo sviluppo embrionale, dalle creste neurali e mantengono la capacità di dividersi con il ricambio dei cheratinociti. Si trovano nello strato basale e sono i responsabili della melanogenesi, il processo biochimico che porta alla formazione della melanina. La formazione di melanina è correlata con la pigmentazione cutanea, essendo essa un polimero chinonico di alto peso molecolare capace di assorbire l'energia emessa dalle radiazioni luminose visibili e dai raggi ultravioletti. L'esposizione ai raggi solari fa aumentare la produzione e l'espressione (con conseguente scurimento della carnagione) proprio per il compito che ha di proteggere i cheratinociti. Insieme al carotene (presente nel derma) è responsabile appunto del colore della pelle [8].

### **1.1.2 Il derma**

Il derma è il secondo strato della cute collocato tra epidermide e ipoderma. La membrana basale (o giunzione dermo-epidermica) che appartiene alla matrice extracellulare. Si presenta come una lamina che separa tessuti differenti (connettivo ed epiteliale) ed è costituita da glicoproteine, proteoglicani e collagene. La membrana basale assolve alcune funzioni fondamentali quali fornire sostegno all'epidermide e favorire il passaggio del sangue dal derma (riccamente vascolarizzato) alla sovrastante epidermide (non vascolarizzata).

Il derma è costituito da tessuto connettivo lasso, che a sua volta si può dividere in due sezioni: derma superficiale e derma profondo. Il derma superficiale è chiamato anche derma avventiziale o papillare, per la presenza di particolari estroflessioni chiamate papille e creste dermiche. Papille e creste dermiche sono chiamate "DEJ" e hanno lo scopo di aumentare la superficie di contatto con l'epidermide e favorire gli scambi.

Il derma profondo, chiamato anche derma reticolare o denso, è ricco di fibre e si estende tra derma papillare (sovrastante) e ipoderma (sottostante).

Il derma profondo è popolato da capillari sanguigni, ghiandole sudoripare e sebacee, follicoli piliferi e nervi.

Due tipi di cellule sono presenti nel derma dell'adulto: le cellule permanenti e le cellule migranti: quelle permanenti includono cellule di strutture organizzate come i nervi, i vasi e le cellule del muscolo pilo erettore e i fibroblasti, che sintetizzano tutti i componenti della matrice extracellulare dermica; le migranti originano nel midollo osseo e comprendono macrofagi, mastociti, eosinofili, neutrofili, cellule T e B e cellule dendritiche interstiziali che conferiscono una sorveglianza immunitaria.

Il derma papillare, immediatamente sotto l'epidermide, ha funzione di ancoraggio meccanico, supporto metabolico e manutenzione trofica per

l'epidermide sovrastante, oltre a fornire terminazioni nervose sensoriali e vasi sanguigni.

Il collagene è una glicoproteina molto complessa con la funzione di sostegno e resistenza meccanica. È un essenziale elemento strutturale di pelle, muscoli, cartilagine, ossa, cornea, muscoli, tendini e legamenti.

Da solo, il collagene rappresenta il 70% delle proteine cutanee, guadagnandosi il titolo di proteina più abbondante dell'organismo [11] ed all'interno dell'organismo, si possono individuare almeno 16 differenti tipi di collagene, che possono essere classificati in base alle caratteristiche distintive, alla collocazione nell'organismo e alla funzione.

Il citoscheletro dei cheratinociti basali è legato alla matrice fibrosa del derma papillare tramite le fibrille di ancoraggio del collagene di tipo VII, che si estendono in profondità nel derma papillare. Come descritto prima, la parte superficiale del derma presenta papille e creste, che interagiscono con lo strato basale dell'epidermide formando la giunzione dermo epidermica.

Lo strato reticolare si fonde con la parte più profonda dello strato papillare. I suoi fasci di collagene sono più spessi di quelli dello strato papillare e si intrecciano tra loro per formare un reticolo molto forte ma deformabile.

### **1.1.3 L'ipoderma**

L'ipoderma - anche conosciuto con il nome di tessuto sottocutaneo, tessuto sottocutaneo adiposo o pannicolo adiposo - viene considerato lo strato più profondo della nostra pelle. È localizzato direttamente sotto al derma, con il quale non vi è una netta e precisa distinzione. Analogamente a quest'ultimo, anche l'ipoderma è costituito da tessuto connettivo, fra le cui fibre si trovano diversi ammassi di adipociti.

Le dimensioni dell'ipoderma variano di molto a seconda della zona del corpo in cui esso si trova. Nelle zone in cui la pelle è quasi a contatto diretto con le ossa o con la cartilagine (come, ad esempio, nel cranio), l'ipoderma è molto sottile; mentre risulta più spesso ed evidente in altre aree (come, ad esempio, le cosce e i glutei).

L'ipoderma svolge molte funzioni importanti per l'intero organismo: costituisce una vera e propria riserva energetica, grazie alla grande quantità di adipociti che lo compongono; partecipa ai meccanismi di termoregolazione, grazie al pannicolo adiposo che impedisce, o comunque rallenta, la dispersione del calore e svolge un'azione "cuscinetto" proteggendo il corpo da eventuali traumi meccanici;

È inoltre in grado di influenzare il metabolismo del nostro corpo tramite il rilascio di particolari sostanze chiamate "sostanze ormonosimili" o adipochine [12].

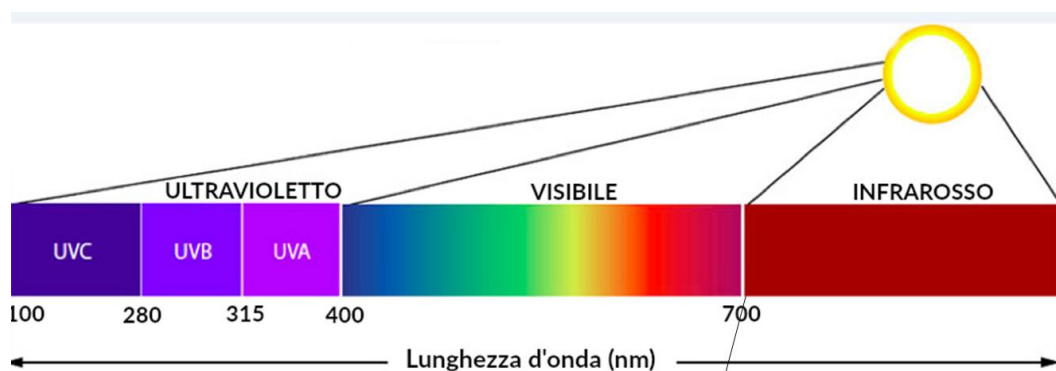
## 1.2 Le radiazioni solari e la loro composizione

La luce del sole è associata da sempre allo stato di benessere fisico diventando con gli anni, associata ad una pelle abbronzata, un simbolo di buon segno di salute e benessere. Ciò ha indotto le persone ad esporsi continuamente all'esposizione solare in contrasto con quanto, da sempre, avvertono i dermatologi sulle conseguenze di una non corretta esposizione.

È bene indicare le caratteristiche principali dei raggi solari, il ruolo ed il significato della melanogenesi e le caratteristiche dei prodotti che applicati sulla cute proteggono dai raggi solari.

Il sole emette radiazioni elettromagnetiche di diverse lunghezze d'onda elettromagnetiche e frequenze, che costituiscono lo spettro elettromagnetico che viene suddiviso in regioni parzialmente sovrapposte.

La radiazione solare che raggiunge la Terra consiste di 6,8% di radiazione ultravioletta (UVR), 38,9% di luce visibile e 54,3% di raggi infrarossi (IR) [13].



*Figura 3.* Lo spettro elettromagnetico [14].

La radiazione infrarossa (IR) ha lunghezze d'onda comprese tra 780 e 1 nm ed è prodotta da qualsiasi corpo caldo.

La radiazione visibile (la semplice luce) ha lunghezza d'onda tra i 400 e i 700 nm, è emessa da corpi incandescenti ed è l'unica percepita dall'occhio umano.

Le radiazioni UV coprono quella porzione dello spettro elettromagnetico con una lunghezza d'onda compresa tra 100 nm a 400 nm e si dividono in tre componenti:

UVA ( $\lambda = 315-400$  nm)

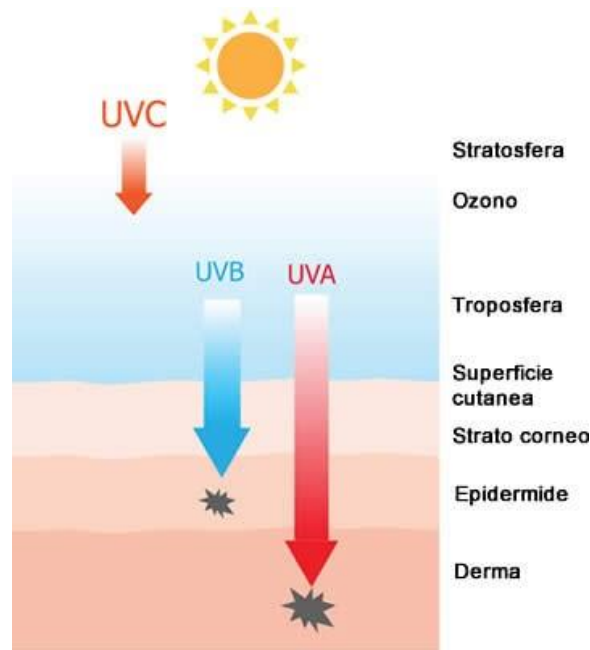
UVB ( $\lambda = 280-315$  nm)

UVC ( $\lambda = 100-280$  nm).

Le radiazioni UVC, a differenza delle radiazioni UVA e UVB, sono quasi completamente assorbite dallo strato di ozono [15].

La capacità di penetrazione nella pelle è direttamente proporzionale alla lunghezza d'onda delle radiazioni stesse. Le radiazioni più penetranti sono quelle dotate di minor energia, mentre le radiazioni ad elevata energia sono quelle che penetrano di meno, svolgendo la loro azione sull'epidermide in superficie.





**Figura 4.** Penetrazione raggi UV nei diversi strati della pelle [16].

Le radiazioni infrarosse sono quelle che penetrano negli strati più profondi della pelle e sono riconosciute attraverso il calore: un'eccessiva esposizione, infatti, può danneggiare la pelle per ipotermia, provocando sintomi che vanno dalla vasodilatazione alla disidratazione. Sebbene anche le radiazioni visibili raggiungano gli strati più profondi della pelle, esse non sono dannose, anzi sono fondamentali per la regolazione di alcune funzioni come il ritmo sonno-veglia e l'andamento circadiano degli ormoni oltre che importanti per la sintesi della vitamina D [17].

## **1.3 Gli effetti dell'esposizione ai raggi ultravioletti**

Con gli anni c'è stata una diminuzione, seppur lieve, dei livelli di ozono nell'atmosfera per l'eccessivo utilizzo di prodotti contenenti alogeni come Cloro e Bromo, i quali, reagendo con l'ozono lo trasformano in ossigeno molecolare e ciò ha comportato un aumento dei raggi UVB sulla superficie terrestre [17].

La sovraesposizione ai raggi UV può provocare effetti sia acuti che cronici non solo sulla pelle, ma anche su altri organi quali occhi e sul sistema immunitario diventando responsabile dell'insorgenza di eritemi, immunodeficienze e invecchiamento cutaneo precoce.

L'esposizione alle radiazioni UV è ritenuta un cancerogeno completo poiché interessa ogni stadio della carcinogenesi: conduce a un danno cellulare a causa di una riduzione di cellule che mediano la risposta immunitaria, della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dell'alterazione del DNA [17].

Di seguito vengono descritti nel dettaglio gli effetti biologici generati dall'esposizione alle radiazioni UVA, UVB e UVC.

### **1.3.1 Le radiazioni UVA e i loro effetti biologici**

I raggi UVA sono i più abbondanti, in quanto rappresentano circa il 95% dei raggi UV e sono in grado di arrivare fino ai melanociti (cellule labili all'azione degli UVA) ossidando la melanina presente (pigmento con funzione di filtro poiché assorbe le radiazioni) e riuscendo quindi a scurire immediatamente la pelle. Arrivando fino al derma, induce diversi cambiamenti che sembrano essere principalmente responsabili del processo e della progressione del fotoinvecchiamento [18].

Come è ben ormai scientificamente noto, l'irradiazione UVA causa la formazione dei ROS, ed è coinvolta anche nel processo di infiammazione.

NF- $\kappa$ B è un eterodimero coinvolto nella risposta infiammatoria della cellula in condizione di stress, che si trova normalmente nel citosol legato alla proteina inibitoria I $\kappa$ B $\alpha$ , la cui trascrizione è attivata dalla presenza di ROS.

Gli UVA stimolano l'attività della chinasi IKK che fosforila I $\kappa$ B $\alpha$  portando alla sua degradazione nel proteasoma e quindi alla liberazione di NF- $\kappa$ B che così trasloca nel nucleo, dove agisce quindi da fattore trascrizionale.

Questo meccanismo porta alla trascrizione dei geni di proteine coinvolte nel fenomeno dell'infiammazione come citochine (IL-1, IL-6), chemochine (IL-8), molecole di adesione (ICAM, VCAM) e di proliferazione (ad esempio la ciclina D1) [19] [20].

L'eccessiva produzione di ROS altera anche l'espressione delle metalloproteinasi (MMPs), coinvolte nei processi di proliferazione, migrazione, apoptosi, angiogenesi e differenziamento, delle mitogen-activated protein kinase (MAPK), che regolano la proliferazione, l'espressione genica e l'apoptosi) e delle cyclin-dependent kinase (CDK), proteine regolatrici del ciclo cellulare [21].

### **1.3.2 Le radiazioni UVB e i loro effetti biologici**

L'UVB rappresenta il restante 5% e raggiunge solo l'epidermide senza la capacità di penetrare nelle sezioni più profonde, ed è il fattore chiave nel danno fotochimico al DNA cellulare.

Questi raggi causano eritemi, ustioni ed abbronzatura ritardata perché inducono l'espressione di geni coinvolti nella sintesi della melanina [22].

Avendo un'energia maggiore degli UVA, sono più dannosi (nonostante siano in quantità minore), perché vengono direttamente assorbiti dalle basi del DNA,

lesionandole, causando direttamente un danno a DNA e RNA inducendo legami covalenti tra pirimidine adiacenti che portano alla formazione di fotoprodotti mutageni come dimeri di ciclopirimidine (CPD) e fotoprodotti 6–4 pirimidina–pirimidone [18].

Basse dosi di UVB vengono tollerate dalla cellula, in quanto riesce a riparare i danni al DNA, alte dosi invece, causano lesioni così gravi da indurre la cellula ad andare in apoptosi.

I raggi UVB possono anche alterare la struttura e la funzione di proteine, interagendo con amminoacidi aromatici.

Inoltre, anche gli UVB stimolano l'attività del fattore trascrizionale NFκB, coinvolto nei fenomeni di infiammazione [22].

### **1.3.3 Le radiazioni UVC e i loro effetti biologici**

I raggi UVC con una lunghezza d'onda minore rappresentano la parte dello spettro elettromagnetico potenzialmente molto dannosa per la pelle. Come detto in precedenza, sebbene abbiano una lunghezza d'onda bassa, posseggono energia molto alta e sono in grado di penetrare la cute ad una profondità di 60–80 μm. I raggi UVC sono particolarmente dannosi per la salute poiché possiedono un alto potere cancerogeno, sono altamente tossici e mutageni per le cellule perché vengono assorbiti da diverse componenti cellulari quali proteine, membrane cellulari e DNA, inoltre, producono specie reattive dell'ossigeno ed il danno causato da questi raggi porta alla morte cellulare per necrosi [18].

Fortunatamente, vengono trattenuti dalla fascia di ozono e per questo non hanno effetti particolari sulla pelle. Il rischio di esposizione a questi raggi aumenta in alta quota [16].

### **1.3.4 Gli effetti delle radiazioni UV sulla cute**

L'esposizione alla radiazione solare è diventato col tempo un evento naturale e quotidiano e vi è un equilibrio in termini di effetti benefici e di danni biologici. Come detto in precedenza, l'esposizione ai raggi UV ha anche degli effetti benefici purché essa sia, e venga mantenuta nelle giuste dosi.

Quando si parla di fototipo si intende il biotipo cutaneo in funzione della reattività alla luce: un famoso dermatologo statunitense, Thomas Fitzpatrick, ha proposto una suddivisione dei tipi di pelle in 6 fototipi, al fine di razionalizzare le modalità di esposizione al sole e si è definito il tipo di pelle in rapporto appunto al comportamento della stessa in occasione dell'esposizione al sole. Questa metodologia si basa su una anamnesi solare con la quale si definisce l'intensità e la durata della reazione eritematosa (scottatura) e la capacità di pigmentazione (abbronzatura), analizzate nei primi 45-60 minuti di esposizione al sole dopo l'inverno o dopo esposizione solare nulla.

La sensibilità degli individui, diversi tra loro, alla radiazione solare è stimata mediante il MED, definito come la Minima Dose Eritematogena, ovvero la più bassa dose di UVR in grado di causare il minimo arrossamento [23].

Il MED è misurato su una scala numerica che varia da individuo a individuo, che va da 0 ad infinito e nella quale la dose minima di raggi UV con i quali si ha un arrossamento è a 1. Solitamente si tende a considerare che fino a 1 MED non si hanno effetti collaterali all'esposizione agli UVR, mentre al di sopra si comincia a verificare, oltre all'arrossamento, anche l'invecchiamento cutaneo ed altre conseguenze ad altri organi [23].



*Figura 5.* Scala del tipo di pelle di Fitzpatrick [24].

### 1.3.5 Effetti positivi delle radiazioni UV

La luce solare può procurare danni a breve e a lungo termine e per questo la pelle necessita di una cura costante, ma ci sono anche notevoli benefici correlati all'esposizione al sole:

- i raggi del sole incentivano la produzione di melanina, che agisce come una protezione naturale per la cute e ne migliora il colorito, favorendo l'abbronzatura;
- l'esposizione al sole è una causa dell'aumento di vitamina D, utile nell'assorbimento del calcio e quindi importante per i bambini in età di sviluppo e per il rafforzamento delle ossa, soprattutto per le donne che dopo i 50 anni sono più soggette a osteoporosi;
- terapie di patologie dermatologiche (cura di diverse patologie quali psoriasi, vitiligine, dermatite atopica)
- produzione di serotonina (prevenzione della depressione).

### **1.3.6 La produzione di Vitamina D**

La produzione della vitamina D in seguito all'assorbimento di raggi UVB avviene mediante conversione diretta di 7-deidrologlobesterolo in vitamina D3 (coleciferolo).

Diversi fattori possono influenzare la produzione cutanea di vitamina D: la forma attivata agisce anche come ormone che regola la funzione di vari organi e sistemi e ha un'azione modulante nei confronti dell'infiammazione e del sistema immunitario [17].

### **1.3.7 La produzione di serotonina**

Un altro prodotto benefico è la serotonina, un ormone e un neurotrasmettitore che, a seconda di dove viene prodotta influenza stati emotivi, appetito, cicli sonno-veglia e altri ritmi umani e contribuisce all'emostasi, all'immunomodulazione e alla percezione del dolore e del prurito.

I raggi UVA sono in grado di inibire l'azione dell'enzima N-acetiltransferasi che converte la serotonina in melatonina, alzando così la concentrazione della serotonina [25].

### **1.3.8 L'abbronzatura**

Come è ben noto, le radiazioni UV del sole o di fonti artificiali aumentano la pigmentazione della pelle.

L'abbronzatura consta di tre fasi quali, l'oscuramento immediato del pigmento (IPD), l'oscuramento persistente del pigmento (PPD) e l'abbronzatura ritardata (DT).

Il primo avviene nei primi minuti di esposizione per poi attenuarsi nel giro di poche ore, mentre il secondo compare entro poche ore dalle dosi più elevate di esposizione ai raggi UVA e persiste per diverse settimane. L'abbronzatura

ritardata è invece quella che compare dopo diversi giorni dall'esposizione ai raggi UVB e permane per settimane, deriva dalla sintesi della melanina nei melanociti, seguita dalla distribuzione della melanina nei cheratinociti vicini.

I raggi UVA e UVB agiscono nel processo della pigmentazione in modo diverso: i primi comportano l'oscuramento immediato che permane per il processo di ossidazione della melanina.

Il motivo per cui la pigmentazione indotta dagli UVA permane più a lungo rispetto agli UVB è spiegato dal fatto, come anche descritto in precedenza, che penetra più in profondità fino al derma.

### **1.3.9 Gli effetti negativi delle radiazioni UV**

Gli effetti negativi delle radiazioni UV sono proporzionali al tempo di esposizione ad essi.

Gli effetti negativi delle radiazioni solari vengono descritti nel dettaglio di seguito.

### **1.3.10 L'eritema solare**

Il termine eritema indica un'irritazione cutanea, che affligge per lo più gli strati esterni della pelle causando un arrossamento della pelle determinato dall'aumentato apporto di sangue ai vasi sanguigni del derma superficiale.

Un'eritema solare, è causata da un'eccessiva esposizione ai raggi ultravioletti (UV) del sole o dall'esposizione a fonti artificiali di raggi UV come i lettini abbronzanti.

I principali fattori di rischio per le scottature comprendono la durata e l'intensità dell'esposizione.

L'eritema è la risposta ad un'esposizione della pelle a entrambe le lunghezze d'onda, UVA e UVB.



La risposta agli UVA è variabile e la conseguente formazione di eritema è soggettivo, può verificarsi o no. Gli UVB producono invece un eritema ritardato, che si instaura dopo 3-4 ore dall'esposizione e può insorgere insieme a dolore, prurito e formazione di bolle [26].

Diversi studi hanno dimostrato che i raggi UVB sono più efficaci per unità di dose ( $J/cm^2$ ) degli UVA di diversi ordini di grandezza nell'indurre eritema [23].

### **1.3.11 La fotocarcinogenesi**

Le radiazioni ultraviolette (UV) sono tra i fattori ambientali più diffusi che influenzano la salute umana e provocano lo sviluppo di cancro alla pelle [27].

Il carcinoma a cellule squamose (CSC) o carcinoma spinocellulare, è la seconda forma più comune di cancro della pelle, caratterizzato da una crescita anomala e accelerata delle cellule squamose. Insorge dai cheratinociti epidermici ed ha una bassa capacità di formare metastasi. Questo tipo di tumore solitamente si sviluppa in zone fotoesposte, ma può anche insorgere in zone non fotoesposte [28].

Il carcinoma a cellule basali (CBC) o carcinoma basocellulare, è la forma più comune e frequente (75%) dei tumori cutanei. Si tratta di un tumore maligno aggressivo e colpisce in prevalenza la cute fotoesposta, in particolare quella del viso e la sua incidenza aumenta con l'età del paziente. Il termine basocellulare deriva dalla somiglianza delle sue cellule a quelle dello strato basale dell'epidermide [28] [29].



**Figura 6.** Carcinoma a cellule squamose [28].



**Figura 7.** Carcinoma a cellule basali [28].

Entrambi questi due tipi di tumori cutanei sono non melanomatosi.

Il melanoma è invece la forma più comunemente fatale di cancro e l'incidenza mondiale è in aumento, in particolare tra gli individui più giovani.

Sono circa 87.000 i nuovi casi/anno diagnosticati negli Stati Uniti, con più di 9000 persone che muoiono di melanoma invasivo.

La sopravvivenza complessiva a 5 anni è del 60%, anche se l'andamento è variabile.

La testa, la schiena e le estremità inferiori (in particolare nelle donne) sono i siti più comuni. Il melanoma si verifica tipicamente nei bianchi dalla pelle chiara [28].

Tuttavia, è il più raro dei tumori cutanei.

È correlato all'esposizione agli UV in particolare a pazienti con precedenti episodi di fotostione.

Raro nelle popolazioni con carnagione scura, questo tipo di tumore può originare 'de novo' dalla cute sana o da una lesione preesistente.

Il melanoma si presenta come macule pigmentate o noduli, che possono mostrare bordi irregolari e ulcerazione. Circa il 15% origina da nevi: vi è dapprima una crescita superficiale ed è la fase in cui può essere maggiormente curato con l'escissione chirurgica. Durante questa fase i melanociti proliferano lateralmente nell'epidermide, ma non metastatizzano. Col passare del tempo possono entrare in una fase di crescita verticale dove le cellule penetrano nel derma reticolare sottostante. La comparsa di un nodulo lungo il margine laterale di un melanoma maligno è un marker della crescita verticale.

Ci sono quattro categorie di base: melanoma a diffusione superficiale, lentigo maligna, melanoma lentiginoso acrale e melanoma nodulare [28].

Il melanoma, può anche svilupparsi a livello oculare, nelle zone dell'iride, corpo ciliare o coroide, prendendo il nome di melanoma uveale.



*Figura 8.* Melanoma [30].

### **1.3.12 I danni oculari**

Le radiazioni UV possono colpire anche gli occhi se non sufficientemente protetti, con conseguenze come fotocheratite e fotocongiuntivite, che sono delle infiammazioni oculari. Una prolungata esposizione, soprattutto ai raggi UVB, causa patologie come pterigio (data da una crescita anomala della congiuntiva sulla cornea) e cataratta (cioè la perdita di trasparenza del cristallino) [31].

Più del 99% della radiazione UV viene assorbita dalla parte anteriore degli occhi, causando, danno corneale, cataratta e degenerazione maculare e nei casi più gravi possono portare alla cecità.

### **1.3.13 Il Fotoinvecchiamento**

Per invecchiamento si intende l'insieme dei molteplici cambiamenti che avvengono all'interno delle cellule e dei tessuti col progredire dell'età; tali cambiamenti hanno come conseguenza l'aumento del rischio di malattie e conducono progressivamente il soggetto al decesso (morte naturale o per malattie).

Le nostre cellule subiscono delle trasformazioni che le rendono difficilmente riconoscibili dal nostro organismo e che pertanto tende ad eliminarle.

Ma l'invecchiamento può essere visto anche come il risultato di un progressivo accumulo di errori nei processi che si svolgono all'interno delle cellule, che perdono così nel tempo la loro funzione. Le cause principali alla base dell'invecchiamento cutaneo sono di natura genetica, costituzionale e ambientale.

Ci sono due tipi di invecchiamento, quello intrinseco e quello estrinseco. L'invecchiamento intrinseco, anche detto cronologico, è legato all'età dell'individuo. Si tratta di un complesso processo biologico che inizia dopo la maturità, che si verifica intorno ai 30 anni d'età e che comporta una graduale diminuzione delle capacità funzionali dei vari organi e un progressivo aumento delle malattie croniche. Gli organi subiscono una riduzione della loro piena funzionalità: dal punto di vista strutturale i tessuti vanno incontro ad atrofia, fattore che porta ad una diminuzione del volume degli organi che, conseguentemente, diventano meno efficienti. Gli ormoni hanno un ruolo importante, come ad esempio in seguito alla menopausa che mostrano una riduzione dello spessore della pelle e una diminuzione della sua idratazione oltre che dell'elasticità.

L'invecchiamento estrinseco, anche detto fotoinvecchiamento, è invece indipendente dall'età e si associa a numerosi fattori come le abitudini di vita e

alimentari, le malattie, l'inquinamento ambientale, l'esposizione alle radiazioni solari ecc.

In particolare, le cellule responsabili della colorazione della pelle (melanociti) possono accumulare mutazioni pericolose anche nelle ore successive all'esposizione solare. I radicali liberi prodotti vanno ad alterare la melanina e quando l'energia viene rilasciata il DNA subisce ulteriori lesioni, anche diverse ore dopo l'esposizione.

L'integrità strutturale della pelle dipende dal collagene. Il collagene è la principale proteina strutturale nei tessuti connettivi come muscoli e articolazioni. Aiuta con flessibilità e capacità di allungamento del muscolo e fornisce alla pelle forza e resistenza. La sintesi di collagene è regolata da eventi intracellulari ed extracellulari: il fattore di crescita, citochina profibrotica TGF- $\beta$ , regola molte funzioni cellulari, tra cui differenziazione, proliferazione e sintesi delle principali proteine della matrice extracellulare, cioè collagene ed elastina. Nella pelle umana, il TGF- $\beta$  inibisce la proliferazione dei cheratinociti e stimola i fibroblasti [32].

Un altro importante regolatore è la proteina 1 dell'attivatore del fattore di trascrizione (AP-1), la cui attivazione porta alla formazione di un dimero delle subunità Jun e Fos. Questa proteina regola l'espressione genica in risposta a stimoli quali citochine, fattori di crescita e stress, e inibisce la sintesi del collagene e ne promuove la decomposizione.

Studi recenti mostrano che l'AP-1 può anche essere indotto dalla proteina 61 (CYR61) ricca di cisteina, che è un altro importante regolatore della sintesi del collagene che viene attivato dalla radiazione UV: il meccanismo attraverso il quale deriva la scomposizione del collagene e l'inibizione della sintesi, tuttavia, dipende dal danno a cui è esposta la pelle e dal tipo di pelle.

La radiazione ultravioletta innesca la formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), che a loro volta attivano il fattore nucleare kappa-B (NF- $\kappa$ B), coinvolto nella risposta infiammatoria della cellula in condizione di stress e promuove l'espressione delle citochine pro-infiammatorie e dei fattori di crescita, rispettivamente l'interleuchina-1 (IL1), il fattore di necrosi tumorale (TNF) e il fattore di crescita epidermica (EGF) che a loro volta vanno ad attivare il pathway regolato dalla protein chinasi, MAPK.

L'attivazione di questi meccanismi determina il potenziamento degli effetti delle metalloproteinasi della matrice extracellulare (MMP). Nello specifico, MMP-1 o collagenasi interstiziale ha come suo target principale il collagene di tipo I, quello più abbondante nel derma e gioca un ruolo cruciale nella degradazione e degenerazione della sostanza amorfa: il meccanismo degradativo della MMP1 inizia con il primo taglio delle fibre di collagene, per poi completare la completa degradazione con il supporto delle MMPs 2-9 [33]. MMP-2 degrada l'elastina e i composti della membrana basale compresi il collagene di tipo IV e VII, mentre MMP-3 mostra la più ampia specificità di substrato per le proteine come il collagene di tipo IV, i proteoglicani, la fibronectina e la laminina [33].

Anche la sintesi del collagene viene ridotta, in seguito all'inibizione della via del TGF- $\beta$ , con riduzione del pro-collagene I e aumento della sintesi di MMP, con conseguente degrado progressivo delle fibre di collagene [32].

## 2. STRESS OSSIDATIVO E RUOLO DEGLI ANTIOSSIDANTI

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) o i radicali liberi e le specie reattive dell'azoto (RNS), o collettivamente RONS sono prodotti del normale metabolismo cellulare e si formano continuamente nelle cellule a seguito di reazioni enzimatiche e non enzimatiche. Sono prodotti da numerosi fattori quali radiazioni, luce ultravioletta, metabolismo di farmaci, prodotti chimici esogeni, fumo di sigaretta, infiammazione, ma anche dalle reazioni di ossidazione endogena durante le normali reazioni metaboliche della cellula.

Pertanto, la loro produzione, è anche un evento fisiologico e varie sostanze che si formano in seguito a eventi radicalici, svolgono funzioni regolatorie nell'organismo: in condizioni fisiologiche partecipano a molti processi come il controllo dell'espressione genica, la trasduzione del segnale, la respirazione cellulare e l'apoptosi.

I radicali dell'ossigeno reagiscono con diversi elementi cellulari come i carboidrati, il DNA, le proteine e i lipidi generando diversi effetti.

L'esposizione cronica ai raggi ultravioletti è dannosa e pericolosa in quanto può penetrare nella cute e compromettere la difesa antiossidante cellulare di diversi tipi cellulari compresi i fibroblasti umani (HDF) cutanei, che svolgono un ruolo importante nel mantenimento della normale struttura e funzione della pelle [34].

Agendo in maniera negativa sulla difesa antiossidante, può portare a disequilibrio tra fattori antiossidanti e radicali, noto come stress ossidativo.

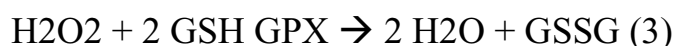
L'anione superossido ( $O_2^{\bullet-}$ ), uno dei principali radicali, è il risultato della riduzione univalente dell'ossigeno diatomico [27] e può generarsi per il trasferimento di elettroni, che occasionalmente sfuggono ai complessi della



catena di trasporto mitocondriale, all'ossigeno molecolare, nel corso di ossidazioni metallo-dipendenti di neurotrasmettitori, quali adrenalina e noradrenalina, e di alcuni composti tiolici, per produzione diretta nel corso di alcune reazioni catalizzate da ossidoreduttasi quali la xantina ossidasi, implicata nel metabolismo delle basi azotate o nei processi di stimolazione delle cellule fagocitarie del sistema immunitario (macrofagi, monociti e granulociti neutrofili) volti alla eliminazione di diversi ceppi batterici mediante il rilascio di radicali liberi e specie ossidanti [35].

La citotossicità dell'anione superossido è parzialmente limitata dalla sua carica negativa, che ne ostacola la diffusione attraverso la membrana mitocondriale, e da processi di dismutazione che possono avvenire sia spontaneamente sia in reazioni catalizzate da enzimi appartenenti alla famiglia delle superossido dismutasi (SOD).

Dalla reazione di dismutazione, si forma perossido di idrogeno, una specie reattiva dell'ossigeno non radicalica, che viene rapidamente neutralizzato dagli enzimi catalasi (2) e glutatione perossidasi (3):



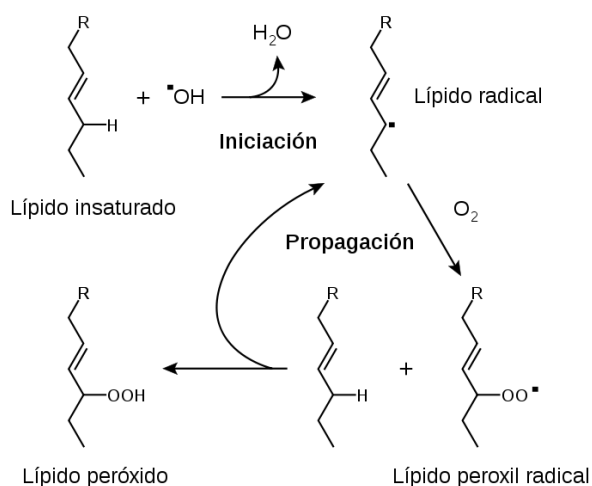
L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> riveste un ruolo importante nei sistemi cellulari, per la sua capacità di diffondere velocemente attraverso le membrane biologiche raggiungendo altri distretti dove può attivare processi perossidativi. Come intermedio, il perossido di idrogeno partecipa a reazioni che inducono la formazione di ROS altamente reattivi, in modo particolare il radicale idrossile (OH•).

L'altro radicale è il radicale idrossile (OH•) un radicale estremamente reattivo reagisce non appena si forma. La sua emivita dura meno di un secondo. Questo significa che la sua concentrazione è estremamente bassa e presenta una reattività tale da poter reagire *in vivo* in prossimità del sito di formazione (entro

pochi Angström). Gran parte del radicale idrossile formato *in vivo*, deriva dall'interazione dell'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con metalli (Mn<sup>+</sup>), quali Ti<sup>3+</sup>, Cu<sup>+</sup>, Fe<sup>2+</sup> o Co<sup>2+</sup> [36].

Uno dei bersagli dei ROS è rappresentato dalla componente fosfolipidica delle membrane e delle lipoproteine plasmatiche. La perossidazione lipidica è un processo causato dall'interazione tra molecole ossidative reattive libere e atomi di idrogeno presenti negli acidi grassi: questo dà origine a radicali lipidici, che sono a loro volta instabili e si legano facilmente all'ossigeno molecolare formando radicali perossili lipidici che sono in grado di ossidare altri lipidi, innescando così una reazione a catena [22].

Le molecole più suscettibili ad un attacco radicalico sono gli acidi grassi insaturi, in particolare i polinsaturi presenti nei fosfolipidi ed il colesterolo che compongono le membrane cellulari. Il principale prodotto di reazione della lipoperossidazione è la malondialdeide (MDA), un'aldeide reattiva in grado di reagire con la deossiguanina e la deossiadenosina del DNA formando composti mutageni, precursori di carcinogenesi.



**Figura 9.** Il processo di perossidazione lipidica [37].

Per stimare la quantità di MDA si sfrutta la sua reattività con l'acido tiobarbiturico (TBA): la condensazione di queste due molecole origina un composto fluorescente facilmente rilevabile spettrofotometricamente [38].

I radicali possono danneggiare anche le proteine modificandone le proprietà fisiche e strutturali e di conseguenza anche la funzione poiché struttura e funzione sono strettamente correlate. Gli aminoacidi più sensibili, ovvero quelli che assorbono maggiormente la radiazione UVB, sono gli aminoacidi aromatici come triptofano e tirosina [22].

Infine, l'azione dannosa dei ROS può esplicarsi anche a livello del DNA sia nucleare che mitocondriale [3].

Il radicale ossidrilico è anche noto per la sua capacità di reagire con tutti i componenti del DNA, danneggiando sia le basi che lo scheletro carbonioso del deossiribosio [39]. La doppia elica viene danneggiata, in modo indiretto dai ROS che reagiscono con gli acidi nucleici, in particolare con le pirimidine, causando danno al DNA.

Esistono però le glicosilasi, specifiche e non, coinvolte nel processo di riparazione per escissione di basi (BER), che riconoscono queste basi modificate e le eliminano dal DNA lasciando un sito abasico, che viene poi processato dalla polimerasi  $\beta$ . Non sempre però la correzione dei danni è efficace: le rotture al singolo filamento (SSB) non riparati nella fase G1 del ciclo cellulare possono generare danni alla doppia elica (DSB) nella fase S [39] e ciò potrebbe portare ad aberrazioni cromosomiche come delezioni, traslocazioni, amplificazioni o addirittura al blocco totale dei processi di replicazione del DNA.

Sembra, però, che gli UVA non siano in grado di causare DSB in maniera diretta, a causa della bassa energia dei loro fotoni [23]. Delle basi puriniche e

pirimidiniche, la guanina risulta essere quella più suscettibile all'ossidazione ed il prodotto di questa reazione, l'8oxoG, è uno dei marker del danno ossidativo al DNA. Questa viene di solito prodotta da lunghezze d'onda di circa 350 nm, mentre lunghezze d'onda più alte causano danni maggiori che possono portare a fenomeni di mutagenesi e cancerogenesi [40].

Anche il DNA mitocondriale è un bersaglio dell'attività dei ROS ed è più sensibile del DNA nucleare a causa della mancanza di un sistema di riparazione e dell'assenza di proteine istoniche [3]. Le mutazioni possono portare alla sintesi di proteine della catena respiratoria alterate, con conseguente aumento di ROS e ulteriori danni al DNA mitocondriale.

## 2.1 Gli antiossidanti

Lo stress ossidativo è un concetto introdotto per la prima volta nella teoria di Denham Harman nel 1956 [41] che indica una condizione patologica, in un organismo vivente, causata dalla rottura dell'equilibrio fisiologico fra la produzione e l'eliminazione di specie chimiche ossidanti, da parte dei sistemi di difesa antiossidanti.

Gli organismi hanno sviluppato un sistema di difesa antiossidante che può essere suddiviso in:

- difese antiossidanti di natura enzimatica e non, che interagiscono direttamente con i radicali liberi;
- complessi metalloproteine/enzimi (come ferritina e transferrina) che riducono la partecipazione di metalli pesanti (come ferro e rame) alla formazione di ROS;
- sistemi che riparano biomolecole dopo che sono state danneggiate dai ROS come polimerasi, lipasi e proteasi.

I sistemi enzimatici principalmente coinvolti sono il superossido dismutasi (SOD) la catalasi (CAT) e il glutatione perossidasi (GPx) [40].

Tutti questi enzimi sfruttano la presenza dello ione di un metallo di transizione redox-attivo. In condizioni ideali la SOD, la CAT e la GPx agiscono in maniera ordinata e sequenziale potenziandosi nel loro importante ruolo di antiossidanti, ma non possono impedire l'instaurarsi del danno cellulare, quando la formazione dei radicali supera le loro capacità tampone o quando i sistemi di protezione sono inefficaci.

Il superossido dismutasi è un metalloenzima, agisce sullo ione superossido ( $O_2^{\bullet}$ ) trasformandolo in ossigeno molecolare ( $O_2$ ) e acqua ossigenata ( $H_2O_2$ ) ed è il primo sistema di difesa contro i danni causati dai ROS.

Esistono 3 isoforme, ognuna delle quali è legata ad un metallo diverso: CuZn-SOD (legata uno ione rame e uno ione zinco), Mn-SOD (legata ad uno ione manganese) e Fe-SOD (unita ad uno ione ferro) [42]. Il MnSOD (SOD2) contenente manganese, localizzato nella matrice mitocondriale, mostra una minima somiglianza con gli altri SOD, che condividono il 60% di omologia attorno ai domini catalitici e leganti il metallo. A causa delle loro distinte localizzazioni e dell'impermeabilità della membrana di  $O_2 \bullet^-$ , si prevede che ciascun membro della famiglia SOD abbia ruoli compartimentati specifici, come la regolazione dei fattori di trascrizione sensibili al redox, il rilevamento del livello di ossigeno mitocondriale o protezione del tessuto circostante dall'infiammazione ossidativa durante l'infezione. Ciò implica che le funzioni SOD non sono ridondanti, nonostante abbiano costanti di velocità simili [43]. Le catalasi sono enzimi, tetrameri, di quattro catene polipeptidiche ciascuna contenente un gruppo ferroso all'interno della struttura tuttavia accessibile tramite canali idrofobici.

Sono note per essere in grado di degradare il perossido di idrogeno, prodotto per stress ossidativo, attraverso la reazione  $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ , con un processo noto come attività catalitica.

Le catalasi agiscono anche come perossidasi [3].

Il glutathione perossidasi è un enzima selenio-dipendente, presente nel citosol e nei mitocondri, con attività perossidasi il cui principale ruolo biologico è quello di proteggere l'organismo dai danni ossidativi. La funzione biochimica del glutathione perossidasi è ridurre gli idroperossidi lipidici ai loro alcoli corrispondenti e ridurre il perossido di idrogeno libero in acqua.

Ne esistono 5 isoforme (GPx-1/GPx-5), che si distinguono per localizzazione cellulare e tissutale [44].

Tra gli enzimi antiossidanti cellulari troviamo anche la paraoxonasi 2 (PON2) che è oggetto della presente tesi e di cui si parlerà in dettaglio nei capitoli successivi.

Ci sono sostanze di origine alimentare che sono in grado di reagire con i radicali liberi. Tra le vitamine, quelle con il maggiore potere antiossidante sono la vitamina C (di tipo idrosolubile) e la vitamina E (di tipo liposolubile).

La vitamina C o acido ascorbico è un potentissimo riducente ed in presenza di ossigeno e metalli tende ad ossidarsi formando acido L-deidroascorbico ed acqua ossigenata, mentre la vitamina E, detta anche tocoferolo, è in grado di prevenire l'ossidazione degli acidi grassi di membrana, evento chiave del processo di lipoperossidazione. La vitamina E è in grado di donare un atomo di idrogeno ai radicali perossili lipidici, rendendoli meno reattivi.

I carotenoidi invece, sono una classe di oltre 600 pigmenti presenti in piante e batteri ma non negli animali: sono pigmenti accessori che assorbono luce ad una lunghezza d'onda diversa rispetto alla clorofilla, infatti hanno un colore giallo-rosso. Negli organismi fotosintetici prendono parte alla catena di trasporto dell'energia e proteggono il centro di reazione dei fotosistemi, coinvolti nel processo di fotosintesi. L'uomo deve assumerli con la dieta e sono dei potenti antiossidanti proprio perché reagiscono contro  $O_2 \bullet^-$  e  $H_2O_2$ . La loro particolarità sta nel fatto che, invece di generare altre reazioni chimiche, dissipano l'energia rilasciandola nel mezzo in cui si trovano e sono quindi subito disponibili per agire su altri radicali liberi. Sono inoltre i precursori della vitamina A (sono definiti, infatti, provitamina A), molto importante per la vista, la crescita ossea e lo sviluppo embrionale [45].

I polifenoli, come indica il nome, sono caratterizzati dalla presenza di gruppi fenolici associati in strutture più o meno complesse ad alto peso molecolare. In natura i polifenoli vengono prodotti dal metabolismo secondario delle piante e

sono molecole antiossidanti in quanto proteggono le cellule dai danni causati dai radicali liberi, che si sviluppano con il normale metabolismo cellulare e a causa di condizioni di stress indotto come radiazioni, fumo, agenti inquinanti, raggi UV, stress emotivo e fisico, additivi chimici, attacchi virali e batterici ecc. I polifenoli si trovano in frutta e verdura e in altri alimenti quali i semi e i cereali integrali. Essi sono più presenti nelle parti aeree di frutta e verdura, piuttosto che nel fusto e nella radice, e maggiormente nella buccia e nella parte della polpa più vicina ad essa.



### 3. CARATTERISTICHE STRUTTURALI E FUNZIONALI DELL'ENZIMA PARAOXONASI 2

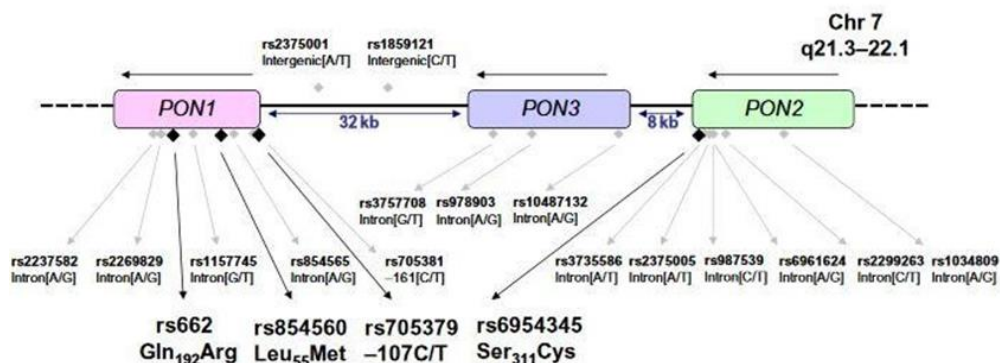
#### 3.1 La famiglia delle Paraoxonasi

La famiglia genica della Paraoxonasi nell'uomo comprende tre membri: PON1, PON2 e PON3.

I prodotti di questi tre geni sono gli enzimi Paraoxonasi 1 (PON1), Paraoxonasi 2 (PON2) e Paraoxonasi 3 (PON3) [46], disposti in tandem sul braccio corto del cromosoma 7 umano (7q21.3-22.1) e sul cromosoma 6 murino (*Figura 10*) [47] [48]. I tre geni sono ben conservati nei mammiferi, e condividono il 79-95% di identità a livello di aminoacidi e l'81-95% di identità a livello di nucleotidi tra le diverse specie [49].

Sulla base di un'analisi filogenetica, PON2 emerge come il membro più anziano di questa famiglia, con PON1 e PON3 che si evolvono da esso. PON2 mostra un'identità di sequenza del 66% e l'81% di somiglianza con PON1.

I geni umani PON1 e PON2 hanno giunzioni esone/introne che si trovano in posizioni equivalenti e solo PON1 ha un codone extra in posizione 106 [50].



*Figura 10.* Locus genico della famiglia PONs e polimorfismi genici comuni [47].

La loro specificità del substrato e la loro localizzazione sottolineano che possono avere diverse funzioni nel corpo umano [51].

Nel 1953 Aldridge per la prima volta definì con questo termine un enzima (paraoxonasi 1, PON1) presente nel siero umano e animale in grado di idrolizzare composti tossici come gli organo fosfati e i gas nervini, tra cui il paraoxone.

Il paraoxone è un metabolita reattivo prodotto, per disulfurazione ossidativa dal sistema del citocromo P-450, a partire dal parathion contenuto negli insetticidi [52] [53]. PON2 e PON3 non condividono con la PON1 questa precisa attività enzimatica ma agiscono su diversi substrati con specificità variabili.

Le PONs sono state riclassificate come lattonasi e possono idrolizzare un certo numero di lattoni acil-omoserina (acil-HCL), molecole che mediano i segnali di quorum-sensing batterico, importanti nella regolazione dell'espressione dei fattori di virulenza e nell'indurre una risposta infiammatoria nell'ospite.

PON1 è una esterasi calcio dipendente sintetizzata prevalentemente dal fegato e secreta nel circolo sanguigno. In circolo la PON1 si associa alle lipoproteine ad alta densità (HDL).

Studi successivi hanno dimostrato che PON1 svolge un ruolo chiave nel determinare le capacità antiossidanti e antinfiammatorie proprie delle HDL [54]. Una diminuzione dell'attività di PON1, a causa di fattori genetici e/o ambientali, si riflette in alterazioni delle funzioni protettive esercitate dalle HDL [53]. Una relazione tra l'attività di PON1 e l'insorgenza di patologie cardiovascolari è stata riportata da numerosi autori [55] [56].

In particolare, una significativa diminuzione dell'attività di PON1 è stata osservata nel siero di pazienti affetti da patologie associate a stress ossidativo come diabete di tipo 1 [57], obesità, ipercolesterolemia [58], insufficienza renale e infarto del miocardio.

Sebbene la maggior parte degli studi siano stati rivolti prevalentemente all'enzima PON1, ottenendo maggiori conoscenze riguardanti la sua struttura oltre che le funzioni, negli ultimi anni c'è stato un crescente interesse nei confronti degli altri due membri della famiglia delle paraoxonasi. Recenti studi hanno evidenziato che PON2 e PON3 svolgono anch'esse un ruolo antiossidante ed è stato evidenziato un loro coinvolgimento, non solo nell'insorgenza di patologie cardiovascolari ma anche in patologie neurodegenerative e patologie tumorali. In particolare, PON2 data la sua localizzazione intracellulare rappresenta un importante enzima di difesa per la cellula.

Nella presente tesi verranno descritte le conoscenze riguardanti la paraoxonasi 2.

### 3.2 Espressione della PON2

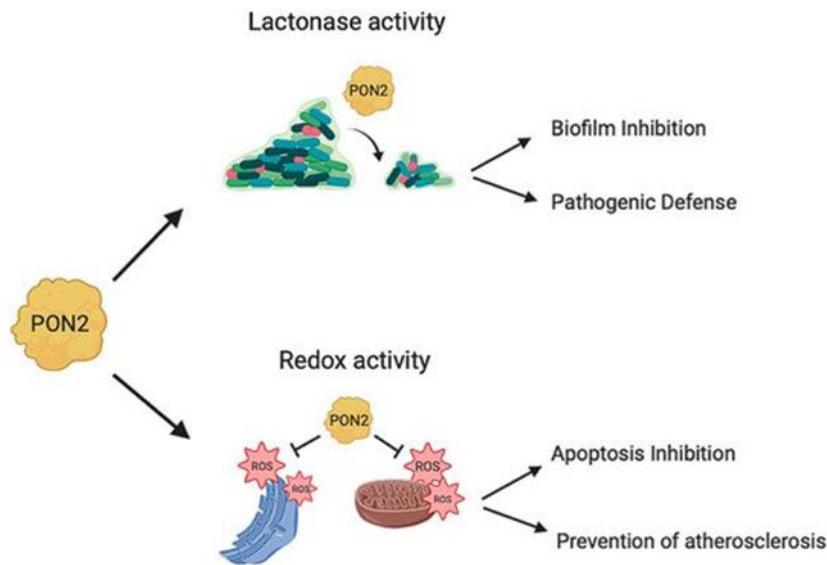
La Paraoxonasi 2 (PON2) appartiene alla famiglia genica PONs, si trova sul braccio lungo del cromosoma 7q21.3 ed è adiacente ai membri della famiglia genica PON1 e PON3 [59]. Si pensa che PON2 sia il più antico dei PONs, da cui PON1 e PON3 si sono evoluti [60].

A livello di struttura genomica, PON2 è organizzato in nove esoni che codificano una proteina di 355 amminoacidi, circa 40-43 kDa in massa [60].

Grazie al suo dominio transmembrana, PON2 è incorporato nel doppio strato lipidico durante la traduzione ed è distribuito tra il reticolo endoplasmatico, la regione perinucleare, i mitocondri e la membrana plasmatica [61].

L'enzima paraoxonase-2 (PON2) possiede proprietà uniche che lo distinguono da PON1 e PON3: è diffuso in molti tipi di tessuti ed è altamente espresso negli organi vitali, come il cuore e i polmoni [62].

PON1 e PON2 hanno simile struttura ma diverse funzioni biologiche: infatti PON2 non può idrolizzare gli organofosfati, come il Paraoxone, ma possiede l'attività lattonasica [49] e pertanto ha un ruolo inibitorio nella formazione di biofilm e nella difesa da infezioni patogene [60], esercita un ruolo protettivo contro la produzione di specie reattive di ossigeno all'interno della catena respiratoria mitocondriale [63], quindi nella riduzione dello stress e danno ossidativo intracellulare. L'attività redox di PON2 inibisce quindi l'apoptosi e previene la formazione di lesioni aterosclerotiche (*Figura 11*) [60].



*Figura 11.* Attività di PON2 [60].

### 3.3 PON2: una proteina altamente espressa

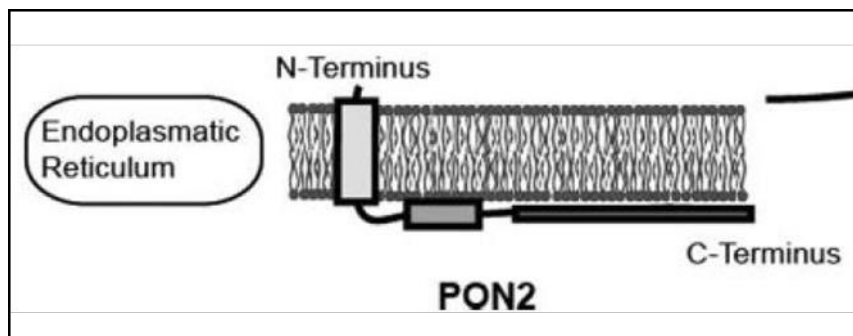
PON2 differisce dalle altre PONs in quanto non è associata alle lipoproteine plasmatiche ma ha una localizzazione intracellulare ed è ampiamente espressa in molti diversi tessuti [1]. Ng et al. [1] hanno dimostrato che i livelli più elevati di trascritti di PON2 si ritrovano nel cuore, nel polmone, nel fegato, nella placenta e nei testicoli. L'espressione di PON2 è stata osservata anche in cellule umane endoteliali primarie e immortalizzate e in cellule della muscolatura liscia arteriosa [59].

La PON2 presenta una lunga coda idrofobica all'N-terminale che gli permette di comportarsi come una proteina trans membrana di tipo II, in grado di occupare l'intero spessore del doppio strato fosfolipidico (*Figura 12*).

Tuttavia, la localizzazione subcellulare di PON2 è ancora oggetto di studio.

Sebbene i primi studi abbiano dimostrato che la PON2 è una proteina intracellulare, le prove ottenute successivamente tramite tecniche di microscopia confocale, frazionamento cellulare e digestione delle proteine di

membrana hanno rivelato che PON2 può trovarsi nella membrana nucleare, nel reticolo endoplasmatico (RE), nella membrana plasmatica e associata ai mitocondri.



**Figura 12.** Il Modello della disposizione della PON2 nelle membrane: il dominio transmembrana N-terminale funge da àncora; la porzione C terminale contiene il dominio enzimatico della proteina che può contrastare la perossidazione lipidica.

Nelle cellule EA.hy 926 (cellule endoteliali vascolari umane) è stata localizzata nel RE e a livello della membrana nucleare [64], mentre nelle linee Caco-2 e HT-29 (adenocarcinoma umano del colon) oltre al reticolo endoplasmatico la PON2 è stata rintracciata a livello della membrana citoplasmatica [65] [66].

Altri lavori sperimentali hanno supposto anche un possibile meccanismo di traslocazione della PON2 dal RE alla membrana plasmatica mediato da alti livelli di  $Ca^{2+}$  intracellulare associati al danno ossidativo.

Questi risultati lasciano supporre che la localizzazione subcellulare sia influenzata dal tipo cellulare in cui la PON2 è espressa.

L'mRNA di PON2 è stato trovato nel cervello umano nelle regioni dopaminergiche, cioè il nucleus accumbens, striato e substantia nigra con livelli inferiori nella corteccia esogena cerebrale, cervelletto e ippocampo [47] [67].

I livelli più alti di PON2 nelle zone dopaminergiche sono interessanti, poiché possono essere collegati al più alto livello di danno ossidativo, dovuto al metabolismo della dopamina, presente proprio in queste regioni.

### 3.4 Caratteristiche strutturali di PON2

#### *Struttura primaria*

Il gene PON2 umano codifica per una proteina di 355 aminoacidi con una massa molecolare di 43 kDa [68]. Della PON2 si conosce la sequenza aminoacidica (Swiss-Prot id Q15165):

MGRLVAVGLLGIALALLGERLLALRNRLKASREVESVDLPHCHLIKGI  
EAGSEDIDILPNGLAFFSVGLKFPGLHSFAPDKPGGILMMDLKEEKPR  
ARELRISRGFDLASFNPHGISTFIDNDDTVYLFVVNHPEFKNTVEIFKFE  
EAENSLHLKTVKHELLPSVNDITAVGPAHFYATNDHYFSDPFLKYLE  
TYLNLHWANVVYYS PNEVKVVAEGFDSANGINISPDDKYIYVADILA  
HEIHVLEKHTNMNLTQLKVLELDTLVDNLSIDPSSGDIWVGCHPNGQ  
KLFVYDPNNPPSSEVLRIQNILCEKPTVTTVYANNGSVLQGSSVASVY  
DGKLLIGTLYHRALYCEL

La sequenza aminoacidica mostra circa il 65% di identità rispetto a quella di PON1 [47].

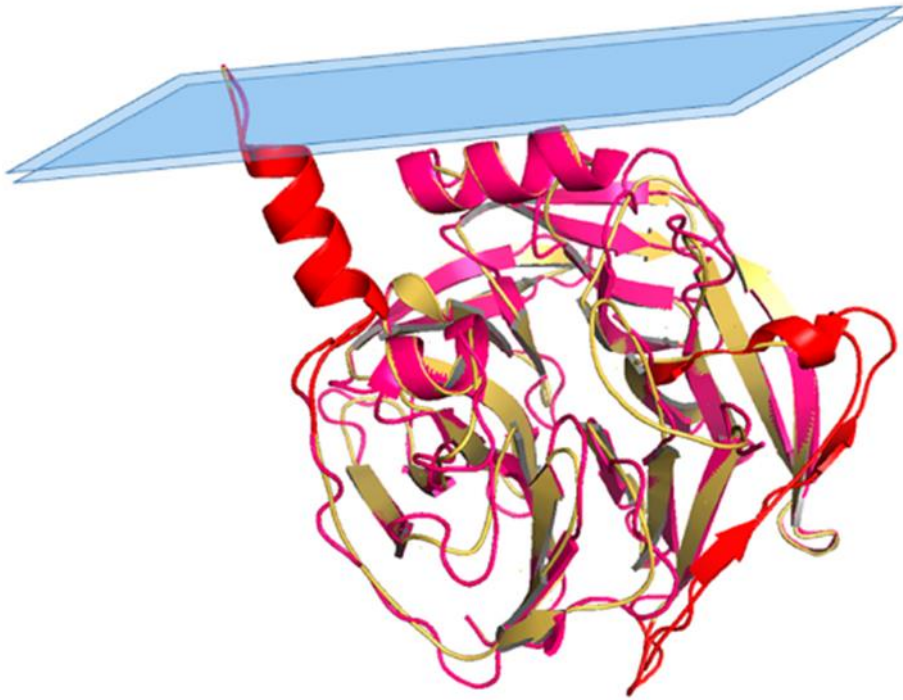
Attraverso la tecnica di immunoblotting sono state isolate due isoforme di PON2 rispettivamente di 40 e 43 kDa. Si pensa che le due isoforme corrispondano alla forma glicosilata e non glicosilata di PON2. Infatti, i residui di asparagina in posizione 254 e 323 possono formare legami N-glicosilici con oligosaccaridi ricchi di mannosio [59]. Tuttavia, il grado di glicosilazione di PON2 è eterogeneo e diversi tipi di cellule mostrano diversi patterns di glicosilazione. La glicosilazione sembra svolgere un ruolo importante soprattutto per aumentare la stabilità della proteina. [69].



### *Struttura tridimensionale*

La struttura di PON2 (come dedotto da PON1) è caratterizzata dalla prima elica  $\alpha$  (H1) all'estremità N che sporge dalla struttura globulare e l'H2 idrofobo che probabilmente interagisce con il bilayer lipidico (**Figura 13**).

L'anello tra D6 e l'elica  $\alpha$ -H1 è coinvolto nella stabilizzazione strutturale di PON1 da diverse interazioni. Guardando al modello PON2, le regioni 18-31 e 92-109 sono molto diverse rispetto a PON1. Il residuo ASN105 di PON1 sembra mancante in PON2 [9].



**Figura 13.** Sovrapposizione strutturale tra modello PON1 e PON2 [9].

La struttura tridimensionale della PON2 non è ancora stata risolta, ma sono state effettuate analisi comparative per estrapolare le caratteristiche strutturali e funzionali della PON2, a partire dalla struttura primaria PON1 (**Figura 14**) [70]. Dati relativi alla sua possibile struttura tridimensionale sono stati ottenuti utilizzando in silico tecniche di modeling (MODELLER 9v7) [70]. Sulla base delle conoscenze acquisite sulla struttura di PON1, questo software ha permesso di predire una possibile struttura tridimensionale di PON2 mostrata in **Figura 14** (codice PDB: 1v04 e 4Q1U).

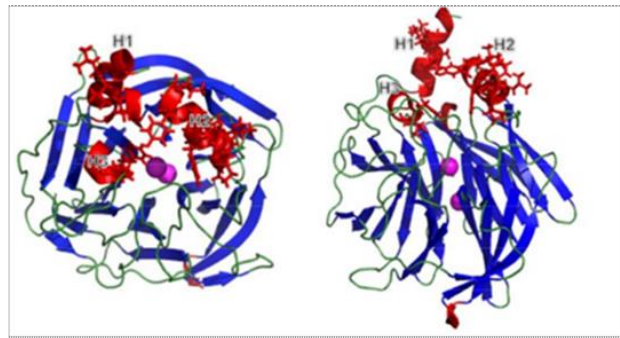
Il modello prevede che la PON2 umana sia costituita da sei strutture ciascuna delle quali è formata da 4 beta-sheet e la tipica chiusura “a velcro” tra estremità N- terminale e C- terminale [70].

Come tutti i membri della famiglia delle paraoxonasi, anche PON2 è un enzima calcio- dipendente. Come mostrato, il modello prevede che i due ioni calcio si trovino al centro della struttura beta-propeller, distanti tra loro 7,2 Å.

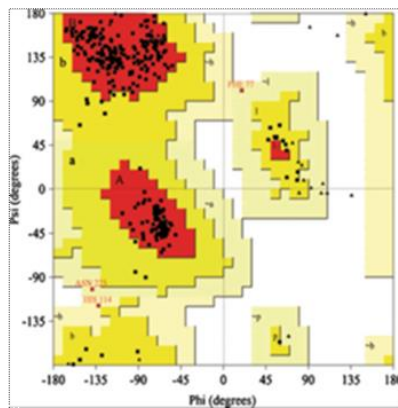
Uno ione  $\text{Ca}^{2+}$ , interagisce con i residui Asp 168, Asp 54, e Ile 116 di PON2, mentre il secondo ione interagisce con i residui Glu 53, Asp 268, 269, Asn 167 e Asn 223 della proteina [70] [59].

Le caratteristiche della struttura tridimensionale proposta sono state confermate dai calcoli ottenuti attraverso il grafico Ramachandran (server SAVS Procheck), riportato nella **Figura 14**, che ha mostrato che l'89% dei residui si trovano nelle regioni più favorevoli [70].

A)



B)



Plot statistics	Best model
Percentage of residue in most favored regions	89.6
Percentage of residue in the additionally allowed	9.4
Percentage of residue in the generously regions	1.0
Percentage of residue in disallowed regions	0.0
Percentage of non-glycine and non-proline residues	100

**Figura 14.** A) Viste superiori e laterali della struttura PON2, che è caratterizzata da una piega dell'elica  $\beta$  a sei eliche (blu) con tre eliche sporgenti (rosso, residui idrofobici all'interno delle eliche sono stati mostrati come bastoncini) e regioni loop (verde). Gli ioni reattivi  $\text{Ca}^{2+}$  (magenta) sono al centro della piega dell'elica. La struttura è stata generata da Robetta sulla base di un PON1 di mammifero (PDB ID 1V0).

B) Ramachandran plot del migliore modello PON2 generato usando il software MODELLER. I calcoli del plot di Ramachandran sulla struttura 3D della PON2 sono stati calcolati utilizzando PROCHECK nel server SAVS [70].

### 3.5 Substrati di PON2

Nonostante le numerose conoscenze acquisite sulla PON2, attualmente i substrati fisiologici di questi enzimi non sono completamente chiariti.

Tuttavia, numerosi studi hanno dimostrato che questi enzimi *in vitro* sono in grado di idrolizzare diversi composti. **Figura 15** [49] [51].

Sebbene la PON2 abbia un'elevata omologia nella sequenza amminoacidica rispetto alla PON1 e alla PON3, questo enzima ha attività catalitiche distinte.

A differenza della PON1, PON2 non è in grado di idrolizzare altri composti come gli esteri organici come il fenilacetato (attività arilsterasi) [49].

Altri studi hanno suggerito che l'attività fisiologica delle paraoxonasi è quella lattonasica, legata cioè alla capacità di idrolizzare i lattoni come la diidrocumarina (DHC) e il 5-Tiolbutil butirrolattone (TBBL) che sono utilizzati come substrati per dosare l'attività lattonasica di PON2 *in vitro* [71].

I substrati PON2 rilevanti dal punto di vista fisiologico sono prodotti dell'ossidazione enzimatica e non enzimatica dell'acido arachidonico e dell'acido docosaenoico (5-HETEL e 4-Hdohe).

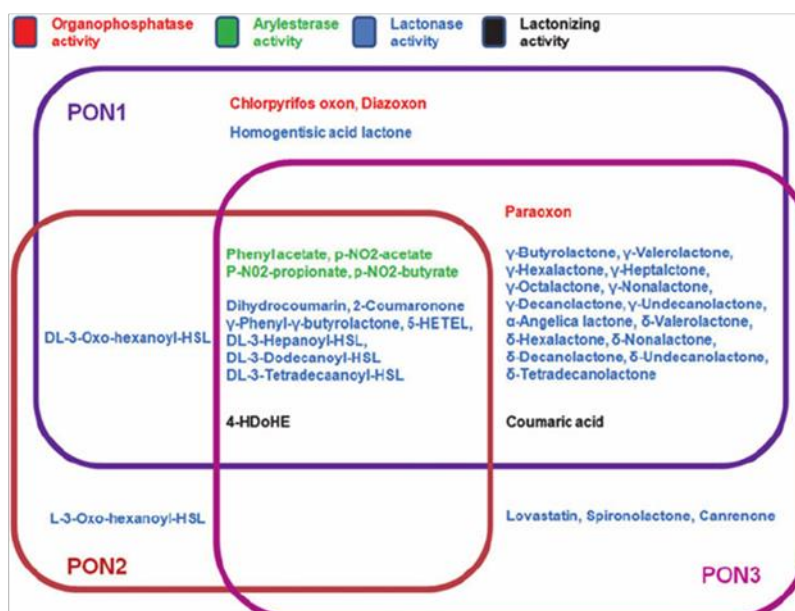
Queste molecole biologicamente attive potrebbero rappresentare importanti substrati fisiologici dell'enzima.

Le PONs possono idrolizzare una serie di lattoni, compresi i lattoni acil-omoserin (acil-HCL), che sono mediatori batterici prodotti da microrganismi patogeni gram-negativi (come *Pseudomonas Aeruginosa*), che svolgono un ruolo importante nel regolare l'espressione dei fattori di virulenza e nell'indurre una risposta infiammatoria dell'ospite. L'attività più alta contro l'acil-HCL è esercitata da PON2 [72] [73] e questo potrebbe essere un fattore importante nella risposta immunitaria innata.

I topi transgenici nei quali è stata soppressa l'espressione di PON2 in seguito alla somministrazione di *Pseudomonas Aeruginosa* hanno mostrato una ridotta

clearance batterica nei polmoni, nel fegato e nella milza rispetto ai topi wildtype [74].

Altri studi hanno dimostrato che nei tessuti periferici PON2 è importante nella modulazione della sensibilità alle proprie infezioni batteriche grazie alla forte attività idrolitica contro l'HCL acile per cui PON2 potrebbe rappresentare un bersaglio farmaceutico per la prevenzione delle infezioni [75].



**Figura 15.** Substrati delle PONs. PON1 in viola, PON2 in rosso e PON3 in rosa.

### **3.6 Azione antiossidante e antinfiammatoria di PON2**

Un'ampia letteratura scientifica supporta che le Paraoxonasi possano svolgere un ruolo protettivo contro lo stress ossidativo e la perossidazione lipidica [1]. La maggior parte degli studi sono stati condotti su PON1 e hanno dimostrato che la sua associazione alle HDL plasmatiche protegge le lipoproteine a bassa densità (LDL) e le membrane plasmatiche dalla perossidazione lipidica [57]. Le LDL ossidate sono citotossiche e pro-infiammatorie e sono in grado di promuovere la risposta infiammatoria e pro-aterogena che caratterizza gli stadi iniziali dell'aterosclerosi. Pertanto, PON1 è in grado di svolgere un ruolo protettivo nei confronti dello sviluppo di patologie cardiovascolari.

Un ruolo antiossidante è stato dimostrato anche per gli altri membri della famiglia della Paraoxonasi.

Studi condotti su colture cellulari e modelli animali hanno dimostrato che analogamente a PON1 anche PON2 svolge un ruolo di protezione contro il danno ossidativo e la perossidazione lipidica. Tuttavia, per la peculiare localizzazione cellulare, PON2 svolge la sua azione antiossidante a livello intracellulare.

Studi condotti su modelli animali hanno evidenziato un ruolo svolto da PON2 nello sviluppo di lesioni aterosclerotiche [76]. Per determinare la funzione antiossidante di PON2 nel processo aterosclerotico, topi nei quali veniva soppressa l'espressione di PON2 e topi di controllo sono stati esposti per quindici settimane ad una dieta ricca di grassi. Rispetto ai controlli, nei topi che non esprimevano l'enzima PON2 sono state osservate lesioni aterosclerotiche più grandi e le LDL isolate sono risultate più suscettibili all'ossidazione, dimostrando che PON2 possiede proprietà anti-aterogene [76].

L'effetto protettivo di PON2 contro il danno ossidativo è stato dimostrato soprattutto in modelli cellulari quali cellule endoteliali vascolari umane (cellule

endoteliali della vena ombelicale, cellule muscolari lisce dell'arteria coronaria umane e fibroblasti umani) dove la soppressione dell'espressione di PON2 causa un significativo aumento della formazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) a livello intracellulare [59]. Al contrario l'over-espressione di PON2 in cellule endoteliali vascolari umane riduceva la formazione intracellulare di ROS a seguito del trattamento con perossido di idrogeno o lipidi ossidati. Le LDL incubate in presenza di cellule che over-esprimevano PON2 presentavano una minore ossidazione rispetto alle LDL incubate con le cellule controllo [59]. Questi studi suggeriscono che l'azione protettiva di PON2 a livello intracellulare potrebbe coadiuvare l'azione esercitata da PON1 associata alle HDL contro lo sviluppo dell'aterosclerosi. Ad esempio, PON2 combatte lo stress ossidativo anche nell'intestino dell'uomo e del topo, nelle cellule epiteliali di carcinoma polmonare [73], nelle cellule tumorali intestinali Caco-2/15 [77] e nei macrofagi murini [78]. PON2 è espressa anche a livello delle cellule neuronali, soprattutto negli astrociti. Studi condotti sia in colture cellulari che su modelli animali, hanno dimostrato che PON2 svolge un ruolo nella protezione contro il danno ossidativo a livello cerebrale che è alla base di molte patologie neurodegenerative. Questi studi, pertanto, hanno suggerito che PON2 possa avere un ruolo neuroprotettivo [79].

Astrociti e neuroni isolati da modelli animali in cui è stata soppressa l'espressione di PON2 (topi PON2 -/-) risultavano più sensibili ai danni (formazione di prodotti di ossidazione e vitalità cellulare) indotti *in vitro* da agenti pro-ossidanti come perossido di idrogeno e 2,3-Dimethoxy- 1,4-naphthoquinone (2,3- DMNQ) rispetto a cellule isolate da topi wild-type, e il grado di sensibilità era correlato al contenuto relativo di PON2 nelle cellule [67] [79].

Come descritto in precedenza, studi sulla distribuzione cellulare hanno mostrato che PON2 è localizzata primariamente nei mitocondri [61] che sono la maggiore fonte di radicali liberi. Questa preponderante localizzazione di PON2 supporta quindi un ruolo nella protezione delle cellule dallo stress ossidativo. È stato dimostrato a tal proposito che nelle cellule endoteliali umane PON2 riduce, in modo specifico, il rilascio del superossido dalla membrana mitocondriale interna [80].

Inoltre, Schweikert et al. [81] hanno dimostrato che PON2 agisce come un potente agente antinfiammatorio contro la risposta infiammatoria causata dalla somministrazione di piocianina, un fattore del quorum sensing batterico.



### **3.7 Meccanismi molecolari alla base del ruolo protettivo di PON2 contro lo stress ossidativo**

È stato ipotizzato che PON2 possa svolgere la sua azione protettiva contro lo stress ossidativo mediante diversi meccanismi molecolari:

Riduzione della formazione di ROS a livello mitocondriale;

Inattivazione di prodotti biologicamente attivi formati a seguito della perossidazione degli acidi grassi a livello dei fosfolipidi delle lipoproteine e delle membrane cellulari.

Come detto precedentemente PON2 è ubiquitaria e a livello intracellulare è localizzata prevalentemente nei mitocondri. In particolare, l'enzima PON2 si trova a livello della membrana interna mitocondriale (IMM), associata al complesso III della catena respiratoria.

A livello della IMM c'è un'elevata produzione di specie reattive dell'ossigeno ROS in grado di causare danni a livello del mitocondrio e di altri comparti cellulari.

È stato dimostrato che PON2 è in grado di interagire con elevata affinità con la coda acilica del coenzima Q10 a livello del complesso III ( $K_D = 4.4 \times 10^{-8}$  M).

La stechiometria di PON2 rispetto Q10 è attualmente sconosciuta. Il semiquinone (coinvolto nel ciclo del coenzima Q) è un radicale libero che si forma dal processo di deidrogenazione da diidroquinone a ubiquinone. Pertanto, è stato suggerito che PON2 possa interagire con l'intermedio reattivo semiquinonico in modo da prevenire la formazione di superossido [61] [82].

Studi condotti su cellule endoteliali umane hanno confermato che PON2 riduce il rilascio di superossido dalla membrana mitocondriale interna [80]. Infatti, in cellule HeLa l'over-espressione di PON2 (cellule PON2+) era in grado di proteggere il mitocondrio da disfunzioni indotte *in vitro*. In particolare, cellule PON2+ trattate con antimicina o oligomicina mostravano una ridotta

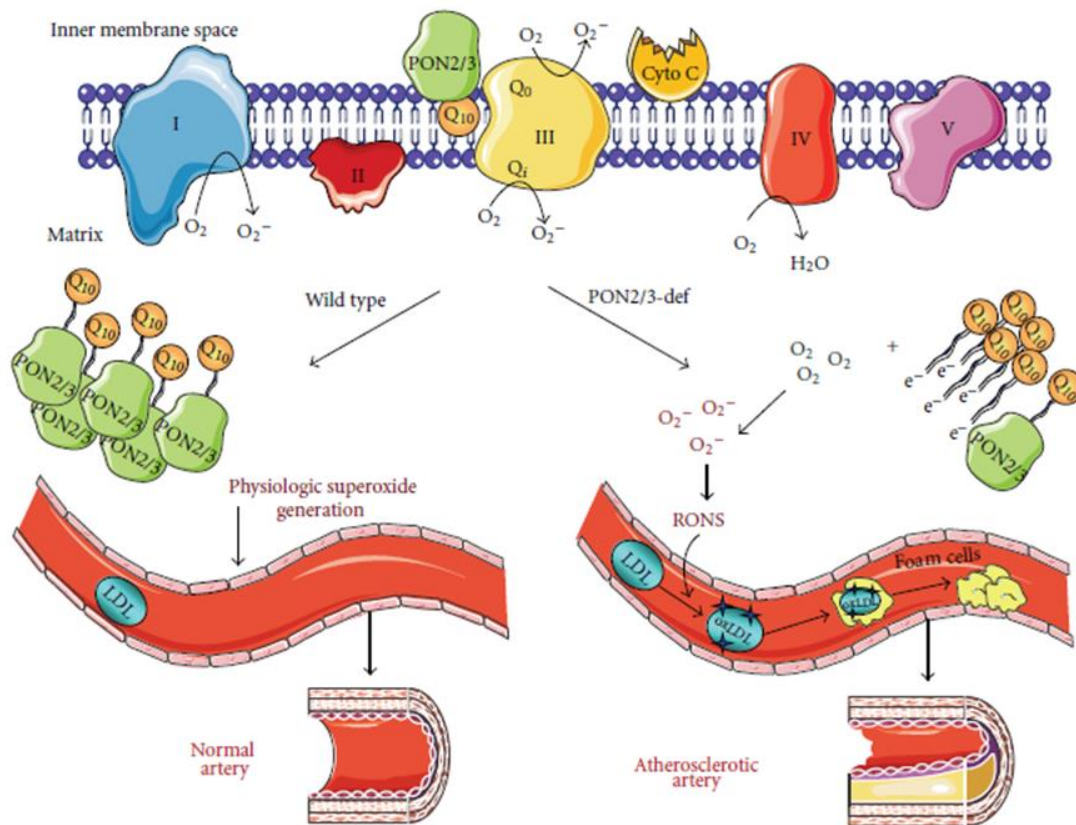
formazione di ROS e una maggiore produzione di ATP rispetto alle cellule controllo [61].

Il ruolo di PON2 nella protezione della funzionalità mitocondriale è confermato da studi su modelli animali. Topi geneticamente modificati nei quali veniva soppressa l'espressione di PON2 (PON2-def), mostrano una riduzione dell'attività del complesso mitocondriale I+III con conseguente ridotta formazione di ATP e un aumento del danno ossidativo a livello mitocondriale. In questi modelli si osserva anche una maggiore suscettibilità all'aterosclerosi come dimostrato da un aumento dei livelli di LDL ossidate e una maggiore predisposizione alla formazione di lesioni aterosclerotiche [61].

Sulla base di queste evidenze è stato suggerito che in carenza di PON2, non si ha l'interazione con il semiquinone. Il semiquinone è un radicale e dona elettroni all'ossigeno molecolare con formazione di superossido che a sua volta genera altre specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto. L'elevata formazione di ROS intracellulare promuove l'ossidazione delle membrane cellulari e delle LDL circolanti. In queste condizioni, la maggiore formazione di LDL ossidate (oxLDL) associata alle proprietà pro-infiammatorie dei macrofagi e monociti pone le basi per lo sviluppo della placca aterosclerotica (*Figura 16*). Al contrario, in topi wild-type PON2 è in grado di interagire in maniera adeguata con il semiquinone riducendo la formazione di superossido e impedendo lo sviluppo di aterosclerosi [82].

Il meccanismo alla base dell'attività antiossidante di PON2 è legato alla capacità dell'enzima di degradare i prodotti bioattivi dell'ossidazione enzimatica e non enzimatica dell'acido arachidonico e dell'acido docosaenoico (5-HETEL e 4-HDoHE) che potrebbero rappresentare potenziali substrati endogeni dell'enzima. L'inattivazione di tali composti da parte di PON2 rappresenta un'azione protettiva e antiaterogena, in quanto questi prodotti,

generati a livello delle membrane cellulari o subcellulari o sulle lipoproteine plasmatiche, sono in grado di propagare il danno perossidativo inducendo una risposta infiammatoria e pro-aterogena.



**Figura 16.** Presentazione schematica del meccanismo antiossidante suggerito di PON2 e PON3.

Un modello attuale per il ruolo della PON2/3 nello sviluppo dell'aterosclerosi [82].

### **3.8 Il ruolo anti apoptotico**

L'apoptosi è un fenomeno biologico che consiste in una sequenza programmata di eventi biochimici che operano all'eliminazione selettiva di cellule danneggiate, infette e potenzialmente neoplastiche dai corpi di organismi multicellulari. L'apoptosi è sotto stretto controllo genetico e può essere attivata da stimoli provenienti da più fonti.

Inizia in risposta a segnali specifici o in presenza di vari stimoli, tra cui l'attivazione del recettore del fattore di necrosi tumorale (TNFR), danno al DNA e le principali alterazioni dello stato omeostatico della cellula [83] [84].

L'apoptosi avviene tipicamente attraverso una delle vie di segnalazione: mitocondriale (intrinseca) e il recettore della morte (estrinseca).

Nei mitocondri il segnale di morte intracellulare induce la via intrinseca di apoptosi.

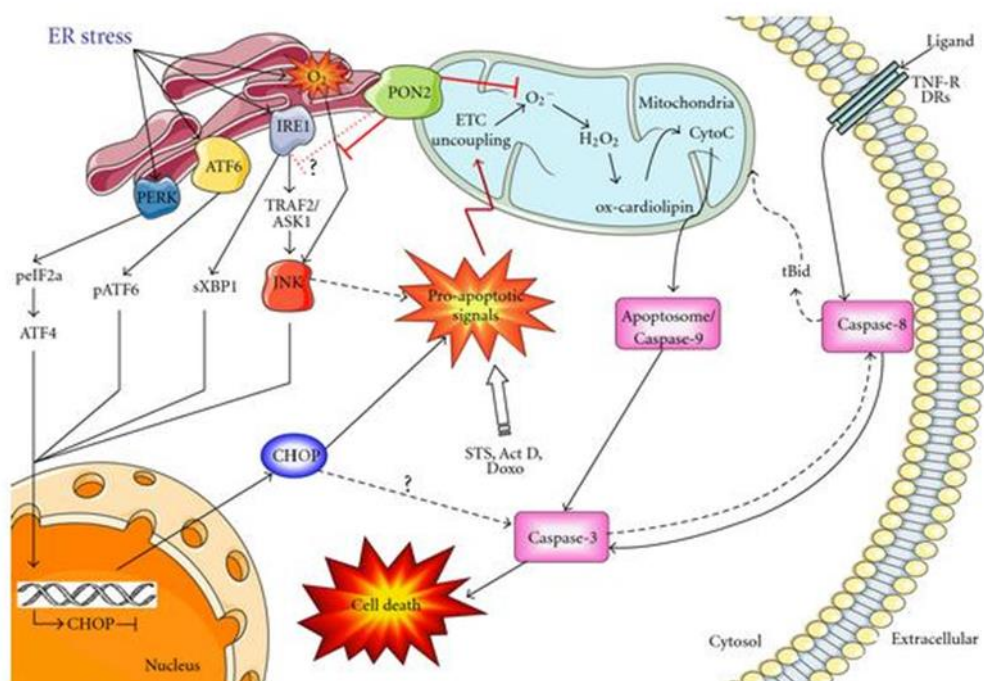
Questi segnali attivano le proteine pro-apoptotiche Bcl-2, che a loro volta portano alla formazione dei canali che modificano la permeabilità della membrana mitocondriale esterna con rilascio di citocromo C nel citosol e conseguente attivazione di caspasi che attivano l'apoptosi cellulare.

Le vie apoptotiche estrinseche iniziano dall'esterno della cellula e non coinvolgono i mitocondri. In questa via, i segnali specifici come il fattore di necrosi tumorale (TNF), Fas Ligand (Fasl) o legante indotto da apoptosi correlata al TNF (TRAIL) si legano ai death receptor transmembrana specifici [85]. Il legame di questi ligandi ai rispettivi specifici recettori promuove il reclutamento del death domain che è associato alla proteina adattatrice Fas (FADD) e l'attivazione della caspasi 8 o 10, la quale attiverà le caspasi effettrici 3/7 che determineranno l'insorgenza dell'apoptosi.

PON2, a causa dell'interazione con il coenzima Q10, diminuisce il rilascio di ossidanti a livello della membrana mitocondriale interna con una minore

perossidazione della cardiolipina e un minor rilascio di citocromo C, fornendo una protezione contro l'apoptosi [82].

Successive indagini, condotte nelle cellule endoteliali, hanno evidenziato che la PON2 è in grado di contrastare anche gli stimoli pro-apoptotici generati in seguito al danno ossidativo indotto a carico del reticolo endoplasmatico, la UPR. A livello molecolare, alti livelli dell'enzima inibiscono la produzione della proteina JNK (c-Jun N-terminal kinases). Normalmente la chinasi è deputata all'attivazione mediante fosforilazione del fattore di trascrizione c-Jun, che diventa così in grado di promuovere la trascrizione di CHOP, un potente fattore pro-apoptotico e successiva attivazione della caspasi [80] [86] come mostrato nella *Figura 17* [87].



**Figura 17.** Presentazione schematica del meccanismo antiapoptotico suggerito per la PON2. La capacità di prevenire la formazione di O<sub>2</sub><sup>-</sup> impatta su entrambi i pathway apoptotici: sia quello indotto dallo stress del RE (tramite l'azione su JNK e CHOP) sia quello che agisce sulla segnalazione mitocondriale proapoptotica come la perossidazione della cardiolipina e il rilascio del citocromo C [87].

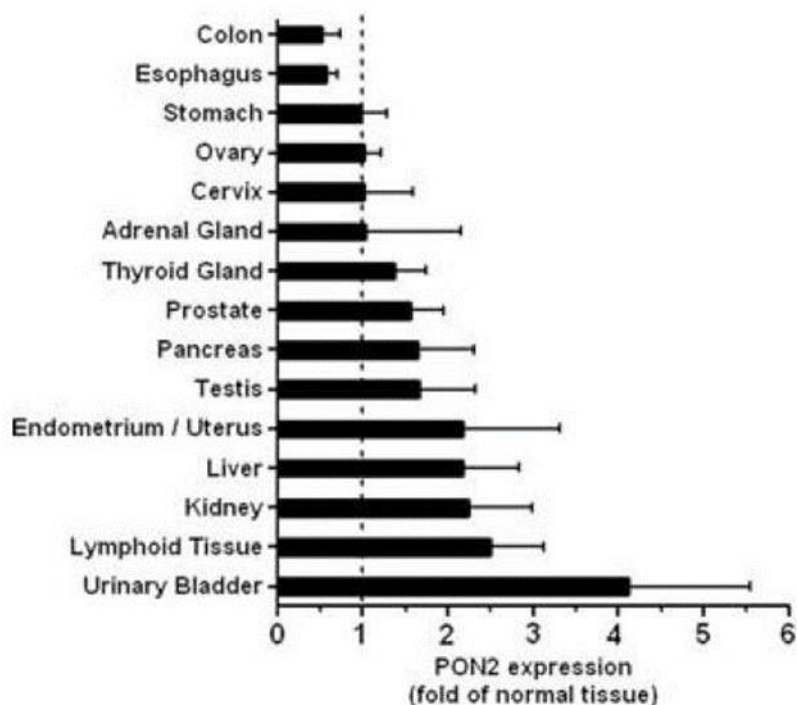
### 3.9 PON2 nelle patologie tumorali

Utilizzando diversi modelli sperimentali, è stato dimostrato che la PON2 all'interno delle cellule svolge un ruolo antiossidante e anti-apoptico.

I livelli espressione di PON2 risultano aumentati in alcuni tumori solidi come carcinoma della prostata, carcinoma renale, carcinoma epatocellulare, cancro della vescica e glioblastoma multiforme (*Figura 18*) [82] [86].

In ambito pediatrico, la sovraregolazione della PON2 in soggetti affetti da leucemia linfoblastica acuta (LLA) è stata associata a prognosi sfavorevole [88].

In alcune forme tumorali anche i livelli intracellulari di PON3 risultano più elevati rispetto alle controparti non neoplastiche e per questa ragione i due enzimi vengono spesso studiati in parallelo.



*Figura 18.* Livelli di espressione della PON2 (proteina) nei tumori in rapporto ai rispettivi tessuti sani [86].

In molte linee cellulari tumorali l'over-espressione della PON2 ha dimostrato conferire un aumento degli indici di proliferazione e sopravvivenza cellulare.

Ad esempio, recentemente, la over-espressione della PON2 nella linea cellulare umana di cancro della vescica urinaria (cellule T24) ha portato ad un aumento significativo di resistenza allo stress ossidativo innescato da tert-butilidroperossido e della proliferazione delle cellule tumorali [89].

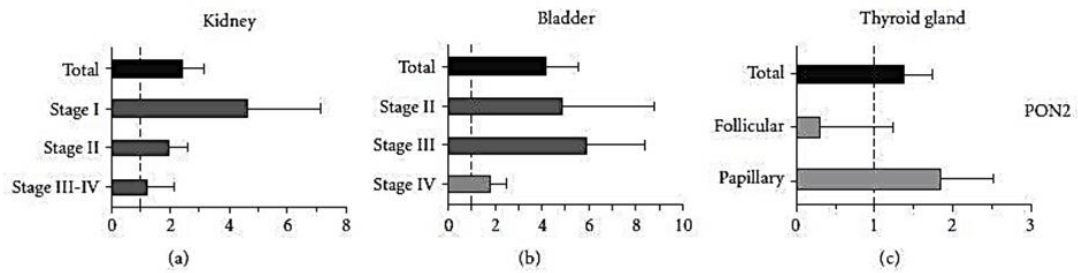
Al contrario il deficit di PON2 causa l'apoptosi di alcune cellule tumorali per sé, senza ulteriori stimoli, contribuendo a sostenere "l'ipotesi oncogenica" per questo enzima [80].

Altri autori hanno dimostrato che anche la resistenza delle cellule tumorali verso i chemioterapici può essere modulata da PON2: ad esempio livelli più alti di PON2 correlano con la resistenza verso l'inibitore delle tirosin-chinasi imatinib usato nel trattamento della leucemia mieloide cronica (LMC) e della leucemia linfoblastica acuta LLA [90].

Un fenomeno interessante è stato evidenziato dagli studi di array su tessuti tumorali e confermato in altri studi più specifici per l'enzima.

Quando l'espressione della PON2 è valutata tenendo in considerazione lo stadio tumorale, la maggior espressione della PON2 risulta appartenere ai tessuti derivanti da neoplasie che si trovano in stadi precoci (*Figura 19*) [82] [89].





**Figura 19.** La PON2 è maggiormente espressa nelle fasi iniziali dello sviluppo neoplastico piuttosto che in quelle tardive. I grafici sono un'elaborazione di recenti dati di array dei livelli di cDNA della PON2 (normalizzati attraverso la GAPDH) ed espressi in relazione ai livelli dei relativi controlli sani [82].

Nagarajan et. al [91] hanno pertanto valutato *in vivo* se l'espressione di PON2 svolgesse un ruolo nella metastatizzazione del tumore pancreatico nei siti dove solitamente si verifica con più frequenza: polmoni e fegato.

Rispetto ai controlli, i tumori knockdown per la PON2 dimostravano ridurre significativamente il numero di metastasi, indicando che la PON2 facilita la crescita e la metastatizzazione multiorgano del tumore pancreatico.

### 3.10 Modulazione dell'espressione e dell'attività di PON2

Studi *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato che l'espressione PON2 e la sua attività enzimatica aumentano durante lo stress ossidativo in diversi tipi di cellule (cellule Hepg2 e macrofagi), in modelli animali (topi alimentati con diete ad alto contenuto di grassi e topi knockout ApoE) [78] [92].

Ad esempio, in macrofagi murini peritoneali (MPM) trattati con vari agenti che inducono stress ossidativo si è dimostrato un aumento dell'espressione di PON2 e della sua attività lattonasica [78].

Un risultato simile è stato ottenuto nei topi diabetici, dimostrando che un aumento dello stress ossidativo è associato ad una maggiore espressione della PON2 cellulare nei macrofagi [93].

Inoltre, è stata osservata una maggiore espressione di PON2 in risposta a vari composti farmaceutici, come l'agente ipolipemizzante Atorvastatina e il farmaco antidiabetico Rosiglitazone o una combinazione con rosiglitazone-metformina-valsartan-Ezetimibe [94]. L'atorvastatina e il rosiglitazone nei HMDM e nei macrofagi murini causano elevata attività di PON2 che correla con una riduzione dello stress ossidativo cellulare [95] [96].

Shiner et.al [97] hanno studiato gli effetti da parte di una serie di sostanze ritenute pro-ossidanti (es. solfato di rame) e antiossidanti (es. Vitamina E) sull'attività lattonasica della PON2 nei macrofagi. Lo studio ha rivelato che, entro certi range di concentrazioni, entrambe le tipologie di sostanze esaltano l'attività enzimatica della PON2. Le sostanze antiossidanti hanno un effetto bifasico sulla PON2: a concentrazioni che lasciano la cellula in uno stato di stress invariato rispetto al controllo, o leggermente diminuito, sembrano non incidere sull'espressione e l'attività della PON2, mentre invece superata una certa soglia di concentrazioni, il processo si inverte esaltando le attività della PON2 (**Figura 20**) [97].

Come per la PON1, sono attualmente in corso studi per investigare l'effetto di fattori dietetici sulla modulazione dell'espressione e dell'attività di PON2.

Shiner et al. [96] hanno dimostrato che i composti polifenolici estratti dal succo di melagrana sono in grado di indurre l'espressione genica di PON2 e aumentare l'attività lattonasica nei macrofagi murini attraverso l'attivazione dei fattori della trascrizione del recettore  $\gamma$  attivato dai proliferatori dei perossisomi (PPAR $\gamma$ ) e della proteina AP-1 [96]. Nello studio di Shiner et al è stato visto che l'effetto dei polifenoli di melagrana era dose-dipendente. Tra i polifenoli maggiormente responsabili dell'induzione vi è la punicalagina che aumenta di circa sei volte l'attività lattonasica di PON2 nei macrofagi. Nell'up-regolazione di PON2 sembra essere coinvolta l'attivazione dei recettori nucleari PPAR $\gamma$  e della proteina AP-1. Si è visto, infatti, che l'inibizione di PPAR $\gamma$  riduceva l'effetto dei polifenoli su PON2.

Inoltre, è stato dimostrato che l'incubazione con la quercetina induce up-regolazione del gene di PON2 e un aumento dei livelli dell'enzima nei macrofagi [98] e in cellule neuronali di topo [79].

Un recente studio ha dimostrato che l'esposizione al fumo di sigaretta induce l'ossidazione dei macrofagi e un aumento dell'attività di PON2. L'incubazione con estratto polifenolico di melagrana riduce gli effetti ossidativi indotti dal fumo di sigaretta [99].

Un altro studio ha dimostrato come l'estratto di Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) porta ad un aumento dell'espressione dell'mRNA di PON2 e della sua attività lattonasica sia nei macrofagi *in vitro* che *in vivo* attraverso la somministrazione a donne [100]. Yerba mate è ricco di polifenoli come l'acido clorogenico e suoi isomeri, acido gallico, caffeico, epicatechine e gallocatechine. Studi *in vitro* e in modelli *in vivo* hanno già dimostrato le proprietà antiossidanti, antiinfiammatorie, ipocolesterolemiche e anti-

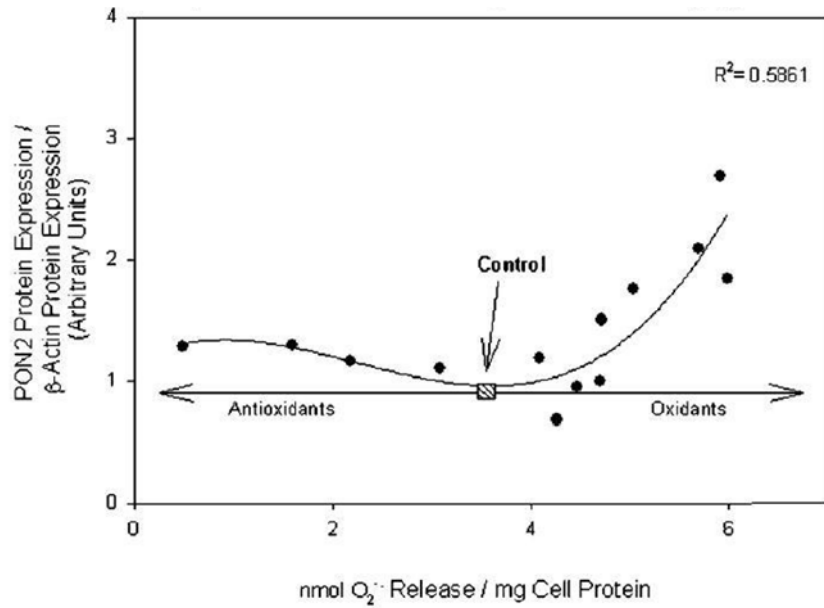
aterosclerotiche di Yerba mate attraverso la capacità di inibire la perossidazione lipidica di plasma e LDL in soggetti sani e quindi sembra esercitare un ruolo importante nella prevenzione di patologie cardiovascolari [101] [102]. Alla luce di questi precedenti studi, si è dimostrato come Yerba mate attraverso i suoi composti polifenolici principali, in particolare l'acido clorogenico, aumenta l'espressione di PON2 e l'attività enzimatica sia arilesterasica che lattonasica *in vitro* a basse concentrazioni, mentre ad alte concentrazioni è responsabile della diminuzione dell'espressione dell'mRNA di PON2. Il meccanismo di questo duplice effetto dell'acido clorogenico sulla regolazione dell'espressione di PON2 non è ancora chiaro, ma si ritiene che possa essere simile al pathway riportato nello studio di Shiner et al. [96] sulla capacità di induzione, nei macrofagi murini, dell'espressione di PON2 e della sua attività lattonasica da parte della quercetina. Nell'ambito dello stesso studio, è stato riscontrato *in vivo* che in leucociti di donne che hanno assunto per una settimana Yerba mate, c'era un incremento dell'espressione genica degli enzimi antiossidanti superossido dismutasi e catalasi. Inoltre, è stato anche visto un incremento dell'attività di PON1 nel plasma e dei livelli di PON2 nei leucociti incubati dopo il trattamento. Alla luce di questo, il consumo di Yerba mate potrebbe diminuire l'accumulo di lipidi ossidati a livello delle arterie e l'avanzamento dell'arterosclerosi grazie alla sua azione su PON2.

In uno studio *in vitro* di Yehuda et al. [103] è stato indagato il ruolo di un isoflavone contenuto nella radice di liquerizia, la glabridina. È stato dimostrato che la glabridina up-regola enzimi antiossidanti come la superossido dismutasi manganese dipendente, la catalasi e la PON2 in macrofagi (J774A1) trattati in condizioni di iperglicemia sia acuta che cronica (25mM glucosio per 3 settimane). La glabridina ha, quindi, la capacità di rafforzare i meccanismi di

difesa antiossidanti e potrebbe svolgere un ruolo importante come agente antiaterogenico nel diabete.

Inoltre, in un recente studio condotto *in vivo*, Yehuda et al. [104] hanno dimostrato che la glabridina ha la capacità di up-regolare l'espressione della PON2 nel fegato e nel muscolo cardiaco di topi in condizioni di iperglicemia e insulino-resistenza.

La comprensione dei meccanismi responsabili della modulazione di PON2 richiede necessariamente ulteriori indagini, soprattutto a fronte del recente interesse nell'uso di sostanze antiossidanti per il trattamento di diverse condizioni fisiopatologiche in cui la PON2 risulta coinvolta, quali diabete, aterosclerosi e neoplasie.



PON2 lactonase activity

Agent (incubation for 24 h)	Superoxide anion (O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> ) release (%)	Lipid peroxide (PD) level (%)	Aldehyde (TBARS) level (%)	PON2 lactonase (TBBL) activity (%)
(A) Oxidants				
{ AAPH (2 mM)	↑23	↑82	↑75	↑262
{ CuSO <sub>4</sub> (10 μM)	↑15	↑83	↑76	↑236
{ Fe-ascorbate (250 mM)	↑20	↑64	↑73	↑325
(B) Anti-oxidants				
{ Punicalagin (10 μM)	↓55	↓20	↓55	↑326
{ Vitamin E (25 μM)	↓65	↓20	↓15	↑162
{ BHT (25 μg/ml)	↓65	↓50	↓60	↑184

**Figura 20.** Relazione bifasica tra lo stress ossidativo cellulare e l'espressione o l'attività della proteina PON2. I macrofagi J774A.1 sono stati incubati con gli agenti ossidanti: AAPH (2 mM), solfato di rame (10 μM) o ferro-ascorbato (250 mM), o con gli antiossidanti: punicalagina (10 μM), vitamina E (25 μM) o idrossitoluene butilato (BHT 25 μg / ml) per 24 ore.

In alto la curva ottenuta correlando l'espressione della PON2 con il rilascio di anioni superossido.

In basso diversi marker dello stato redox cellulare in correlazione con l'attività lattonasica della PON2 nei medesimi campioni trattati [97].

### **3.11 Fattori genetici**

Il gene PON2 umano ha due polimorfismi comuni, che si traducono in sostituzioni amminoacidiche di un'alanina (A) o glicina (G) al codone 148 (A148G) e una cisteina (C) o serina (S) al codone 311 (C311S) [1]. Sulla base delle prove attuali, la maggior parte delle popolazioni porta l'allele A al codone 148 e l'allele S al codone 311 [62].

Molti studi hanno studiato le frequenze del polimorfismo genico PON2 in diversi gruppi etnici.

Il polimorfismo A148G è correlato alla variazione del colesterolo totale e delle LDL, con livelli di glucosio nel plasma a digiuno e con il peso alla nascita [46]. L'associazione tra PON2 e polimorfismo 148 è stata correlata al diabete non insulino-dipendente ed è stato visto negli aborigeni canadesi [105], nel diabete di tipo 2 negli americani [106], e in problemi neonatali delle popolazioni asiatiche [107] [108].

Il polimorfismo C311S è correlato con la malattia coronarica, ictus ischemico in pazienti con diabete mellito di tipo 2, con la malattia di Alzheimer e con la ridotta massa ossea nelle donne in post-menopausa [46]. La variante della PON2 311 è stata associata a malattie coronariche nelle persone asiatiche e cinesi e iraniane, a una malattia coronarica nelle donne cinesi e ad infarto miocardico acuto nelle persone italiane [109] [110] [111] [112] [113].

Questa variabilità suggerisce che le differenze etniche, le interazioni gene-gene e la suscettibilità ai fattori ambientali potrebbero modulare la relazione tra i polimorfismi PON2 e l'insorgenza di numerose malattie umane.

# **MATERIALI E METODI**

## **4.1 Materiali**

Tutti i materiali per le colture cellulari sono stati acquistati da Euroclone (Euroclone, Italia). Tutti reagenti per le analisi in citofluorimetria e i reattivi per le analisi di Western blot, sono stati acquistati dalla ditta Merck Millipore (Darmstadt, Germania).

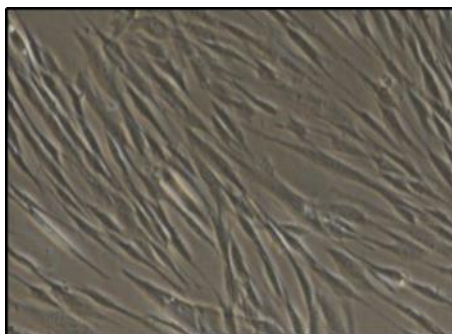
## **4.2 Metodi**

### **4.2.1 Modello cellulare utilizzato**

Nel presente lavoro di tesi sono state utilizzate le cellule HDF (Human Dermal Fibroblast) neonatali. La linea cellulare HDF è stata incubata a 37°C con atmosfera umidificata al 5% di CO<sub>2</sub> ed è stata fatta crescere in adesione, mantenuta in terreno D-MEM (Dulbecco-Modified Eagle's Medium) supplementato con 10% di FBS (Fetal Bovine Serum), 1% di glutammina, 1% di penicillina/streptomicina e 1% di aminoacidi non essenziali. Il terreno completo è stato mantenuto a +4° C in camera fredda e preriscaldato prima di venire utilizzato, in un bagnetto termostato, fino al raggiungimento di 37°C cioè la temperatura necessaria per evitare qualsiasi tipo di shock termico.

Le HDF crescono in monostrato e sono caratterizzate dall'inibizione da contatto assumendo la tipica forma fusiforme una volta raggiunta la confluenza del 100%. (*Figura 21*).





**Figura 21.** Linea cellulare utilizzata per gli esperimenti.  
Cellule HDF (Human Dermal fibroblast cells).

Nell'allestimento della coltura cellulare è fondamentale mantenere la massima sterilità, utilizzando non solo supporti sterili, ma anche prendendo tutti i possibili accorgimenti utili ad evitare qualsiasi tipo di contaminazione, poiché materiali come i mezzi di coltura rappresentano l'habitat ideale per lo sviluppo e la crescita di batteri, lieviti e funghi. A tal proposito tutti i reattivi utilizzati per il trattamento delle colture sono stati sterilizzati mediante l'utilizzo dell'alcool 70%.

Una volta raggiunto il 70/80 % di confluenza, le cellule sono state staccate e successivamente seminate su piastre multiwell o su petri per l'allestimento dei vari esperimenti, o su fiasche F25 o F75 per l'espansione cellulare al fine di avere la cosiddetta coltura di mantenimento.

Gli esperimenti sono stati condotti tra il 10° e il 19° passaggio.

Le cellule HDF sono state piastrate in quantità differente secondo quanto suggerito dal produttore a seconda dei diversi supporti utilizzati per l'irraggiamento (dishes 52mm, multiwell 6) in maniera tale da poterle esporre all'azione dei raggi UVA.

Arrivate dopo diversi giorni dalla semina ad una confluenza di circa 70-80%, è stato rimosso il mezzo e le cellule adese sono state lavate con 5 mL di

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 10X senza calcio e magnesio (PBS) ed esposte ai raggi UVA secondo il seguente schema:

- Controllo (nessuna esposizione ai raggi UVA)
- esposizione UVA 5'
- esposizione UVA 10'
- esposizione UVA 15'

Dopo queste prime esposizioni ai raggi UVA, basandoci anche su studi trovati in letteratura condotti su cellule HDF, è stata scelta la condizione di esposizione ai raggi UVA di 10'.

Sono stati allestiti nuovi esperimenti a questo time point per osservarne sia l'effetto citotossico sia l'effetto modulatorio dell'enzima PON2 anche in diversi tempi di recupero, incubandole a 37°C con atmosfera umidificata al 5% di CO<sub>2</sub>.

Le condizioni adottate sono state le seguenti:

- Controllo (nessuna esposizione ai raggi UVA)
- esposizione (UVA 10')
- esposizione (UVA 10') + 2h recupero
- esposizione (UVA 10') + 4h recupero
- esposizione (UVA 10') + 24h recupero

Nel presente lavoro di tesi si è voluto indagare se l'espressione della PON2 che viene modulata dall'esposizione ai raggi UVA potesse essere mitigata dalla presenza di una crema solare, che funziona da schermo contro i raggi UVA.

La crema è una crema solare SPF 30, con formulazione innovativa prodotta in USA e presente in commercio. Contiene 3 filtri solari (etiliesil salicilato, homosalato e butilmetossidibenzoilmetano) che filtrano sia la porzione del UVA che del UVB. L'apposita quantità di crema (2 mg/cm<sup>2</sup> secondo il

regolamento COLIPA) è stata spalmata con un dito coperto con un guanto di lattice, su vetrini circolari di quarzo, perfettamente combacianti con i pozzetti delle piastre multiwell da 6 impiegate per le colture cellulari.

La quantità di crema precedentemente calcolata e pesata, e' stata prelevata con una pipetta e puntali appositi, e spalmata delicatamente e in modo uniforme su tutta la superficie del vetrino utilizzando l'indice ricoperto da un guanto in lattice. I vetrini così preparati sono stati mantenuti al buio 30 min prima dell'irraggiamento.

Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando il seguente schema:

- Controllo (nessuna esposizione ai raggi UVA)
- esposizione (UVA 10')
- esposizione (UVA 10') + crema
- esposizione (UVA 10') + 2h recupero
- esposizione (UVA 10' + crema) + 2h recupero

## 4.2.2 Irraggiamento con lampada solare UVA

L'irraggiamento delle colture cellulari con raggia UVA è stato effettuato mediante una lampada solare abbronzante commerciale, una Philips Original Home Solarium (modello 80 406/A; Philips, Groningen, Olanda, dotata di bulbo Philips HPA, Uv tipo 3; erogante un flusso di 50 mW/cm<sup>2</sup> tra 300 e 400 nm (*Figura 22*). La lampada è stata poggiata in posizione orizzontale su un supporto apposito, tale da poter irraggiare i campioni dall'alto ad una distanza di 20 cm dalla sorgente luminosa.

Le cellule da trattare sono state lavate e coperte con uno strato sottile di PBS (1mL) e successivamente irraggiate con raggi UVA. Prima dell'esposizione, il coperchio di plastica della multiwell è stato rimosso e sostituito da vetrini circolari di quarzo contenenti o meno la crema spalmata come descritto sopra. Dopo aver collocato la piastra multiwell su un blocco di ottone incassato nel ghiaccio al fine di ridurre l'evaporazione, le cellule sono state irraggiate per tempi diversi a seconda dell'esperimento. Per esempio, per poter valutare la produzione di ROS, la vitalità e l'espressione della PON2 in presenza ed in assenza di crema solare, le cellule sono state irraggiate per 10 min (180 kJ/m<sup>2</sup>), una dose che approssimativamente equivale a circa 60 minuti di esposizione al sole nella riviera francese (Nizza) in estate a mezzogiorno.

Terminato il periodo di irraggiamento, il PBS è stato rimosso e sostituito con il mezzo di coltura cellulare fresco. Gli esperimenti sono stati condotti in acuto (tempo 0, ovvero subito dopo irraggiamento) e a distanza di 2, 4 e 24 h post-irraggiamento dei fibroblasti.



*Figura 22.* Lampada abbronzante solare commerciale Philips Original Home Solarium

#### **4.2.3 Estratto proteico totale e quantificazione proteica mediante metodo BCA**

Dopo l'esposizione ai raggi UVA, per ogni condizione sperimentale, le cellule sono state staccate o con l'utilizzo del cell scraper o per azione della tripsina (5 minuti a 37 °C al 5% CO<sub>2</sub>). Per le analisi western blott, le dishes 32 mm nelle diverse condizioni sperimentali, sono state poste in ghiaccio e mediante cell-scraper le cellule sono state staccate in presenza di PBS freddo (4°C). Per quanto riguarda la determinazione della vitalità cellulare e dei radicali liberi, le cellule sono state staccate con tripsina, l'enzima più frequentemente impiegato per la disgregazione poiché ben tollerato da molti tessuti e facilmente neutralizzabile dal siero fetale bovino contenuto nel mezzo di coltura.

Nei pellet cellulari ottenuti mediante centrifugazione a 10' a 13000 rpm a 4°C è stata eseguita l'estrazione proteica mediante cocktail: inibitore di proteasi 50X e RIPA buffer. Gli estratti sono stati congelati a -80°C. I campioni sono

stati scongelati per permettere la lisi cellulare da shock termico, e centrifugati per recuperare l'estratto proteico (600g per 10 minuti a 4°C). La quantificazione delle proteine è stata effettuata mediante metodo BCA [114]. Il metodo si basa sulla capacità delle proteine di ridurre gli ioni rameici a rameosi in ambiente basico. Gli ioni rameosi reagiscono con il reagente di Acido Bicinconinico (BCA), formando un complesso viola-porpora. La reazione viene seguita per 30 minuti a 37°C. Il colore viene misurato alla lunghezza d'onda di 562 nm ed è lineare con la concentrazione proteica.

#### **4.2.4 Analisi dell'espressione proteica mediante Western Blot**

L'espressione dell'enzima PON2 e delle proteine Ga-modificate in seguito all'irraggiamento da UVA è stata valutata mediante la tecnica del Western Blot in tutte le condizioni sperimentali. È una tecnica che permette di identificare una determinata proteina, mediante il riconoscimento da parte di specifici anticorpi. La miscela di proteine viene separata in condizioni denaturanti SDS-page, in base alle loro dimensioni utilizzando un gel di poliacrilammide.

Un quantitativo di circa 25µg dell'estratto proteico ottenuto da ciascun campione è stato sottoposto ad elettroforesi impiegando un running gel ad una concentrazione di poliacrilamide pari al 12%. Al termine della corsa elettroforetica le proteine sono state trasferite dal gel ad una membrana di fluoruro di polivinilidene (PVDF). Il gel è stato immerso nel tampone di trasferimento per 10', mentre la membrana di PVDF, essendo altamente idrofobica, è stata dapprima immersa in metanolo 100% per alcuni secondi, quindi in acqua per 2-3 minuti ed infine nel tampone di trasferimento per 30'. Il trasferimento delle proteine è stato condotto overnight, a 20 V costanti, a 4°C. Successivamente la membrana è stata bloccata per 5' a temperatura ambiente ed è stata poi incubata con anticorpi policlonali di anti-PON2 o con

Anti-AGE (Advanced Glycated End-products) (Merk Millipore) in BSA 1 % per 1 ora e mezza a temperatura ambiente. Dopo i lavaggi effettuati con TBS-TWEEN20 1%, la membrana è stata incubata con l'anticorpo secondario idoneo per 1 ora e mezza.

Dopo aver eseguito altri lavaggi, si è passato alla rivelazione delle bande mediante Immobilon cresendo (Biorad) al Chemidoc (Biorad). Le bande sono state analizzate mediante l'utilizzo del software ImageLab (Bio-Rad).

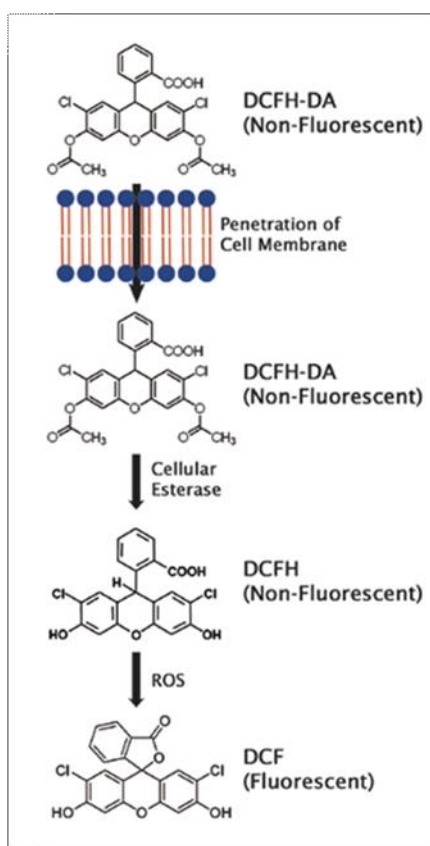
#### **4.2.5 Analisi della vitalità cellulare e dei livelli intracellulari dei ROS**

L'analisi dei livelli intracellulari di ROS è stata effettuata in fluorimetria mediante l'utilizzo della diclorofluoresceina diacetato (DCFH-DA), tale saggio è comunemente adottato per valutare la produzione intracellulare di perossidi. La sonda diffonde facilmente all'interno delle cellule e viene idrolizzata dalle esterasi intracellulari che rimuovono i gruppi acetati rendendola polare e quindi impermeabile. Il nuovo viene ossidato a livello intracellulare dai ROS dando origine alla formazione di 2,7-diclorofluoresceina (DCF), una molecola altamente fluorescente che emette ad una lunghezza d'onda di 532 nm (*Figura 23*). L'incremento di fluorescenza nel tempo è proporzionale ai livelli di ROS intracellulari e perciò la capacità antiossidante dell'estratto può essere correlata alla fluorescenza della sonda.

Le cellule sono state marcate con la sonda ad una concentrazione finale di 1  $\mu$ M e incubate a 37°C al buio per 30 min; successivamente l'eccesso di sonda è stata eliminata con un serie di lavaggi in PBS e le cellule nelle diverse condizioni sono state staccate con l'utilizzo della tripsina.

Le cellule sono state trasferite in eppendorf, centrifugate a 600g per 5' a 4°C,

e risospese in 200  $\mu\text{L}$  di PBS. Di questi, 50 $\mu\text{L}$  sono stati trasferiti in eppendorf precedentemente preparate contenenti 200  $\mu\text{L}$  di sonda Via Count millipore opportunamente diluita secondo datasheet, e posti per 5 minuti in ghiaccio e al buio. Questa sonda è in grado di fornire un dato quantitativo di cellule vive, morte e apoptotiche. Trascorso il tempo di incubazione è stata effettuata la lettura al citofluorimetro (Millipore-Guava easyCyte).



**Figura 23.** Meccanismo d'azione della DCF-DA nei saggi ossidativo intracellulare.



### **4.3 Analisi statistica dei risultati**

Gli esperimenti sono stati condotti effettuando il triplicato sia tecnico che sperimentale e i dati ottenuti sono stati analizzati mediante i test statistici One Way Anova, utilizzando il Tukey Test come fattore di correzione nel caso delle comparazioni multiple. I dati sulla vitalità cellulare e sui livelli intracellulari di ROS sono rappresentati come istogrammi che illustrano la media più o meno l'errore standard (SEM) della percentuale di cellule ad elevato contenuto di ROS. L'analisi densitometrica delle bande relative all'espressione proteica è stata effettuata mediante ImageLab (Bio-Rad), software, normalizzando i dati contro la vinculina di ciascun campione.

# RISULTATI

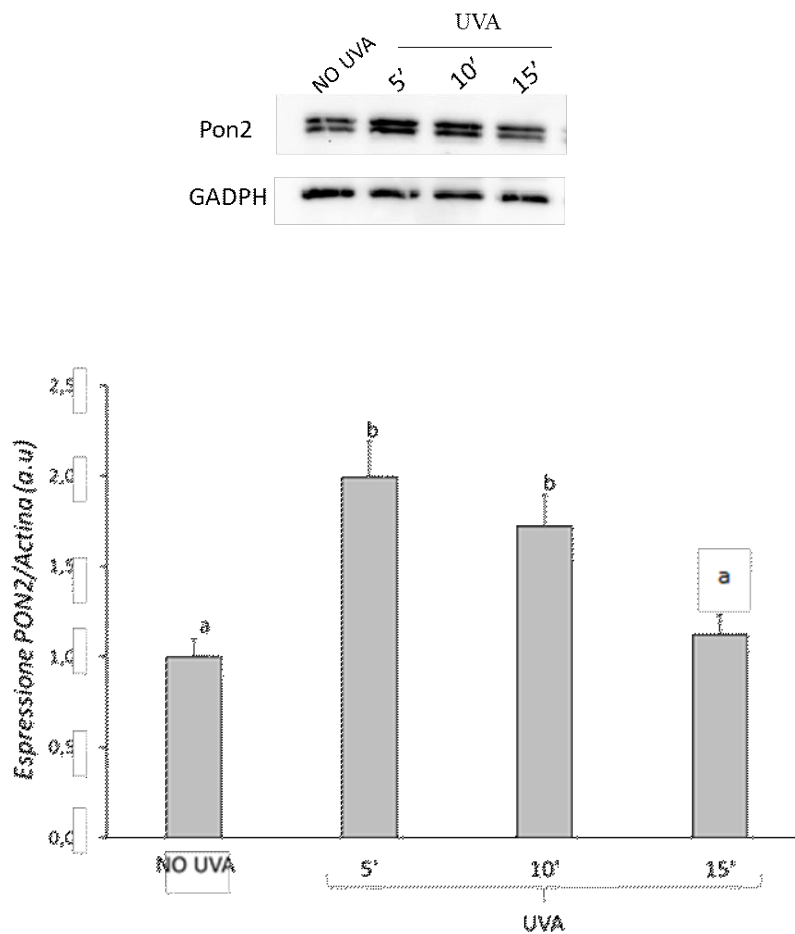
## 5.1 Effetto dell'esposizione a raggi UVA sull'espressione dell'enzima PON2 in fibroblasti dermici

Lo studio è stato eseguito utilizzando un modello *in vitro* di cellule neonatali di derma umano (HDF, human dermal fibroblasts), sottoposte ad irraggiamento con raggi UVA emessi da una lampada UVA (Philips Original Home Solarium).

In una fase preliminare dello studio, al fine di identificare il tempo ottimale di irraggiamento, le cellule sono state sottoposte ad irraggiamento per tempi diversi, 5, 10 e 15 minuti e al termine di ogni trattamento sono stati valutati i livelli di PON2 cellulari mediante Western blot.

In **figura 24** è riportato la variazione dell'espressione di PON2 nelle diverse condizioni sperimentali. L'analisi densitometrica delle bande ha mostrato un significativo aumento dell'espressione della PON2 nelle cellule irraggiate rispetto alla condizione di controllo (no UVA). La variazione è significativa dopo 5 e 10 minuti con un incremento di 1.9 e di 1.7 rispettivamente rispetto al controllo ( $p < 0,05$ ). L'esposizione per 15 minuti non induce differenze significative rispetto alla condizione di controllo.

Tuttavia, a 15 minuti le cellule presentavano modifiche morfologiche e una mortalità troppo elevata per permettere analisi successive, pertanto si è deciso di utilizzare per gli esperimenti successivi la condizione di irraggiamento con UVA a 10 minuti (T0).



**Figura 24:** Modulazione della PON2 a seguito di esposizione a raggi UVA: Analisi densitometrica dell'espressione di PON2 in cellule HUDE in seguito all'esposizione ai raggi UVA per 5, 10 e 15 minuti. I dati sono normalizzati con GADPH ed espressi come media  $\pm$  SD, n = 3. Lettere diverse indicano differenze statistiche tra i campioni (test di confronto multiplo post-hoc di Tukey,  $p < 0,05$ ).

## **5.2 Effetto dell'esposizione a raggi UVA sulla vitalità cellulare e sulla produzione intracellulare di ROS e AGEs in cellule HDF a diversi time point post-irraggiamento**

L'analisi citofluorimetrica della vitalità cellulare è stata effettuata tramite l'impiego di un'apposita miscela di due fluorocromi (ViaCount), in grado di discriminare le cellule vive da quelle apoptotiche e morte. L'analisi è stata eseguita in cellule HDF, esposte a raggi UVA per 10 minuti (T0) e dopo 2h, 4h, 24h dall'esposizione.

Come mostrato nella *figura 25*, l'irraggiamento per 10 minuti causa una significativa diminuzione della percentuale di cellule vive (circa il 70%) e un aumento significativo delle cellule morte ed apoptotiche rispetto alle cellule di controllo ( $p < 0,05$ ). Nella fase post-irraggiamento, si assiste ad un aumento della vitalità cellulare e ad una conseguente diminuzione della mortalità rispetto al T0, osservabile già a due ore e in tutte le altre misurazioni condotte nei diversi time points ( $p < 0,05$ ).

Contemporaneamente all'analisi della vitalità cellulare e con le stesse condizioni sperimentali, sono stati analizzati al citofluorimetro anche i livelli intracellulari di specie reattive dell'ossigeno (ROS), utilizzando la sonda DCFDH2, una forma ridotta di fluoresceina la cui intensità di fluorescenza risulta direttamente proporzionale alla quantità di radicali liberi presenti all'interno delle cellule vitali, a loro volta discriminate tramite il simultaneo impiego di ViaCount. Per mettere meglio in evidenza la produzione dei ROS in seguito all'insulto ossidativo, rappresentato dall'irraggiamento con raggi UVA, la popolazione cellulare è stata suddivisa in cellule con un basso, medio e alto contenuto di ROS, regioni stabilite arbitrariamente definendo su una

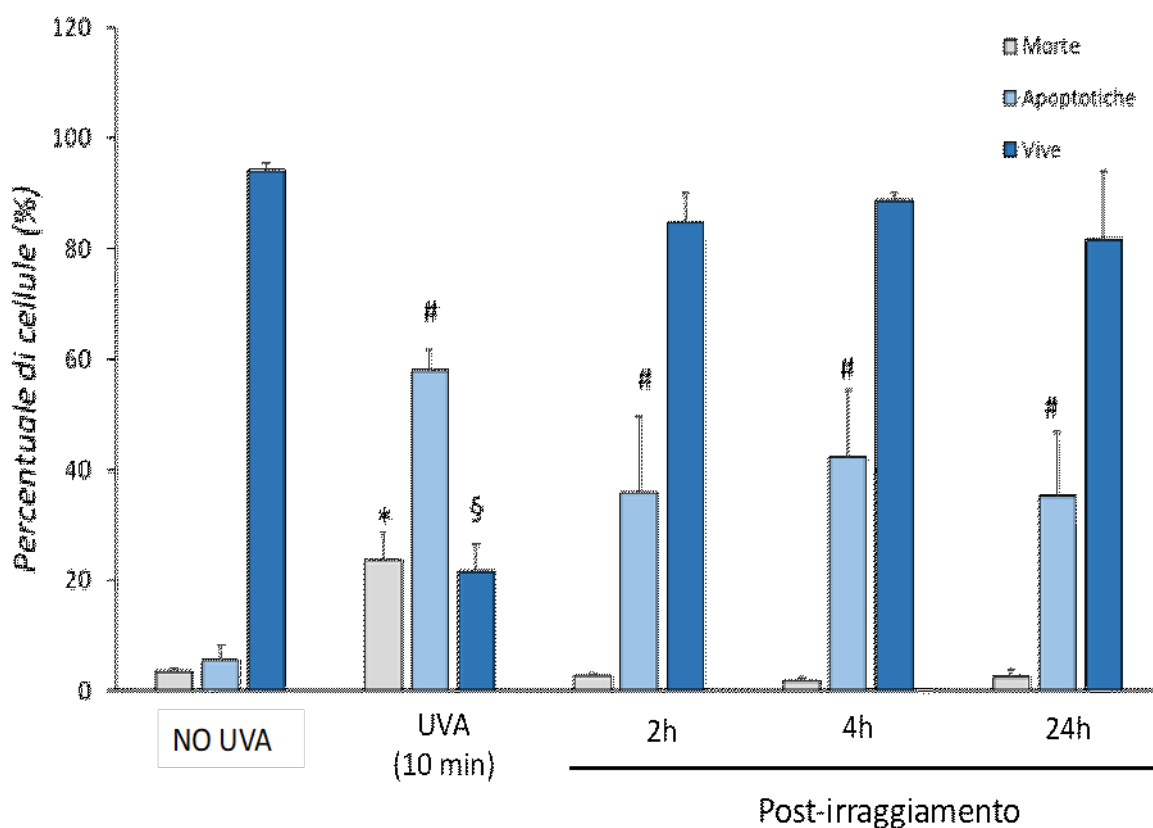
popolazione di controllo negativo non irraggiato la regione alto contenuto pari al 10% e basso contenuto di ROS pari al 90% della popolazione totale.

Come mostrato nella **figura 26**, l'esposizione dei fibroblasti all'irraggiamento con UVA per 10 minuti induce un aumento dei livelli di ROS intracellulari con un significativo l'aumento della percentuale di cellule con un alto contenuto di ROS di circa 80% ( $p < 0,05$ ). Nella fase post-irraggiamento, si assiste ad una diminuzione dei livelli di ROS intracellulari. La diminuzione è osservabile in tutte le misurazioni condotte nei diversi time points ( $p < 0,05$ ).

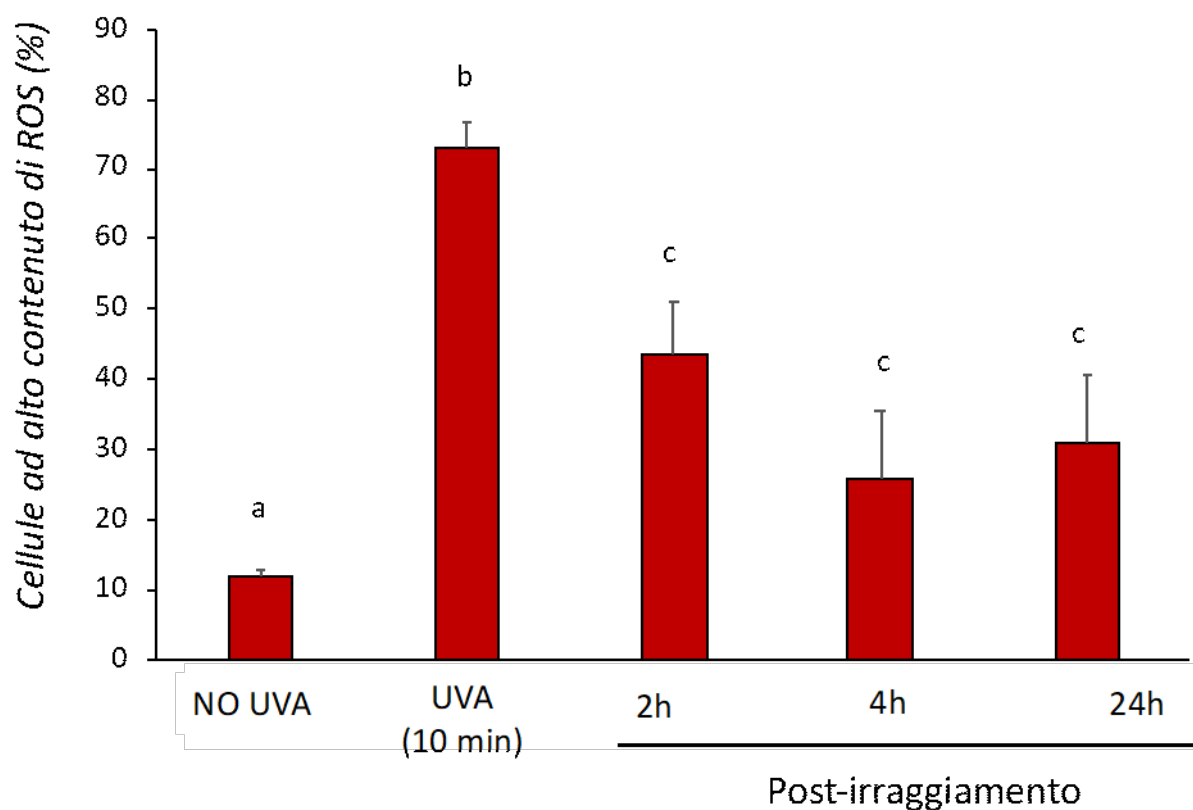
I dati sono in linea con la vitalità cellulare, come mostrato nella **figura 27**, una correlazione negativa è stata stabilita tra la percentuale di cellule vive e percentuale di cellule ad alto contenuto di ROS in cellule HDF trattate nelle diverse condizioni sperimentali ( $r = -0,91$ ,  $p < 0,05$ ).

A fine di caratterizzare ulteriormente il danno indotto dai raggi UVA sulle cellule è stata valutata la formazione di intermedi altamente reattivi della reazione di Maillard, come i composti di glicazione avanzata (AGEs), che si formano a seguito della reazione di glicazione non enzimatica delle proteine. In particolare, mediante Western-blott sono stati valutati i livelli di GA-proteins ossia proteine legate alla glicolaldeide. Come mostrato nella **figura 28**, un significativo aumento di GA-proteins si osserva nelle cellule irraggiate per 10 minuti rispetto alle cellule non irraggiate ( $p < 0,05$ ). Come i ROS, anche i livelli di GA proteins tendono a diminuire nella fase post-irraggiamento.

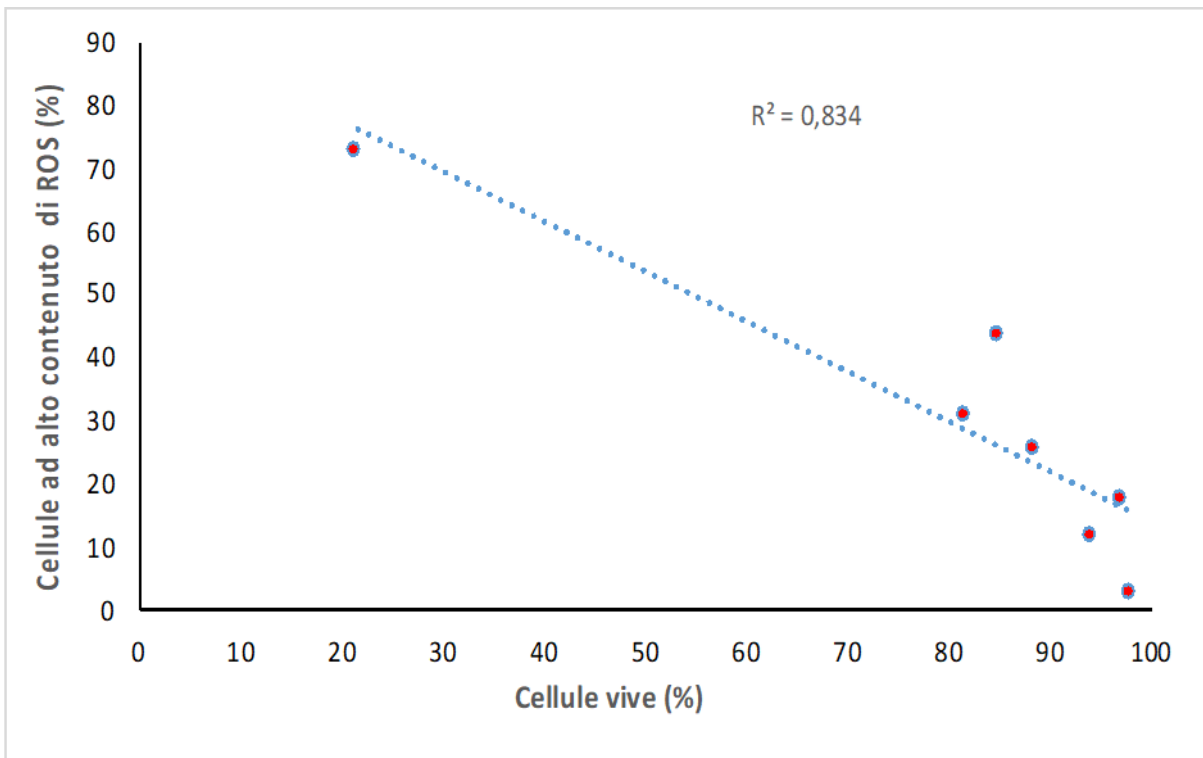
*I risultati indicano che UVA inducono un'azione citotossica e che i ROS sono i mediatori chiave dell'azione citotossica indotta dall'esposizione ai raggi UVA. Inoltre, i risultati dimostrano che nella fase post-irraggiamento le cellule attivano dei meccanismi che permettono di ridurre la formazione di ROS e di conseguenza di permettere alle cellule di proliferare, tuttavia le condizioni non ritornano, nemmeno dopo 24 ore, alle condizioni delle cellule non trattate.*



**Figura 25.** Effetto dell'esposizione a raggi UVA sulla vitalità cellulare: Percentuale (%) di cellule morte, apoptotiche e vive in cellule HDF non irraggiate (NO UVA) o esposte a 10 minuti d'irraggiamento (UVA) e in cellule dopo 2 h, 4 h e 24 h dopo l'esposizione. I dati sono espressi come media  $\pm$ SEM, n = 3. Lettere diverse indicano differenze statistiche tra i campioni (test di confronto multiplo post-hoc di Tukey,  $p < 0,05$ ).

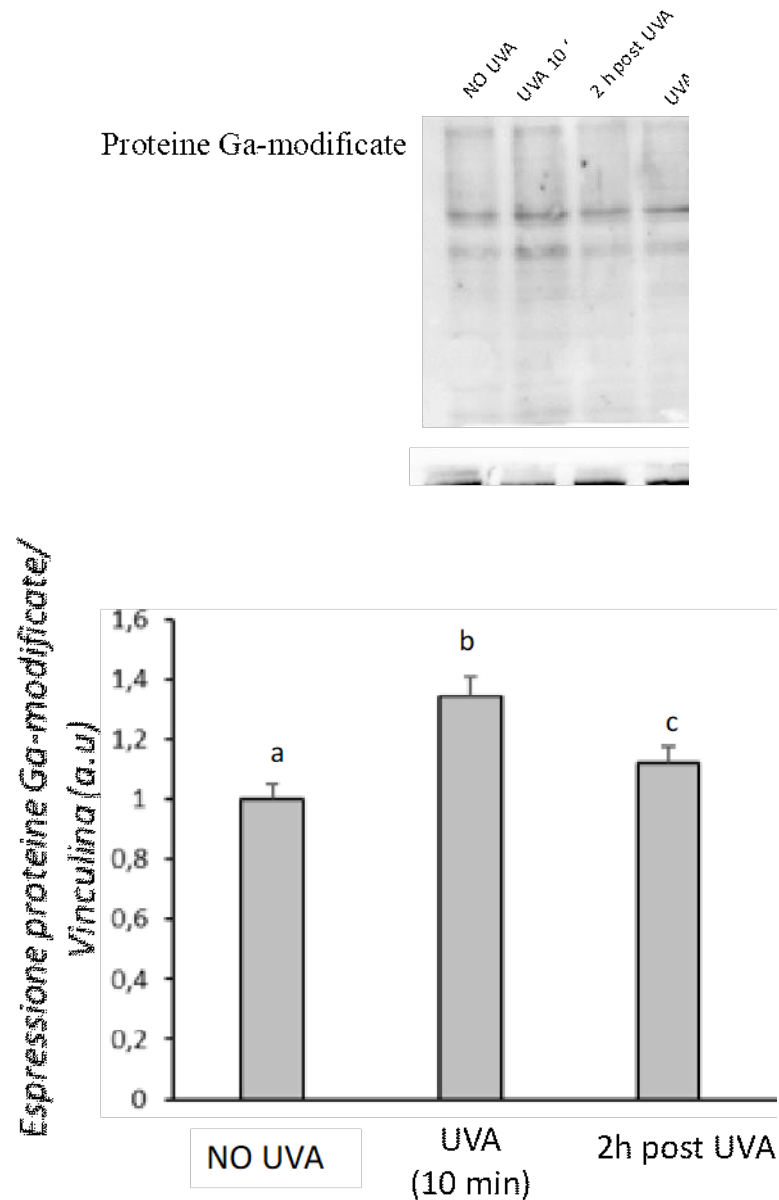


**Figura 26.** Effetto dell'esposizione a UVA sulla formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) Percentuale (%) di cellule ad alto contenuto di ROS in cellule in cellule HDF non irradiate (NO UVA) o esposte a 10 minuti d'irraggiamento (UVA) e in cellule dopo 2 h, 4 h e 24 h dopo l'esposizione. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM,  $n = 3$ . Lettere diverse indicano differenze statistiche tra i campioni (test di confronto multiplo post-hoc di Tukey,  $p < 0,05$ ).



**Figura 27.** Relazione tra vitalità e produzione intracellulare di ROS.  
Relazione tra percentuale di cellule vive e percentuale di cellule ad alto contenuto di ROS in cellule HDF trattate nelle diverse condizioni sperimentali.





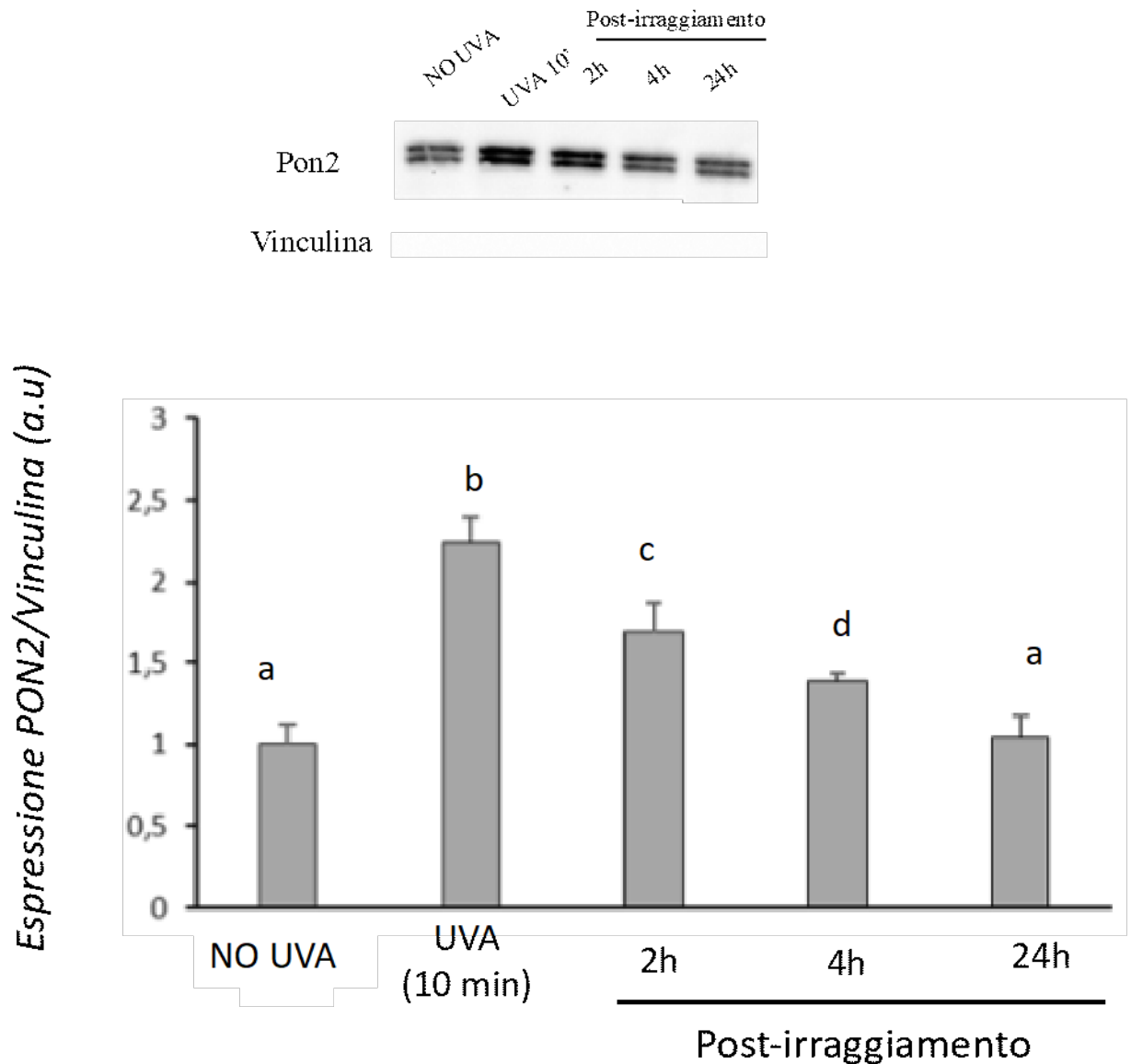
**Figura 28.** Effetto dell'esposizione a UVA sulla formazione di composti di glicazione avanzata. Livelli di GA-proteins in cellule HDF non irraggiate (NO UVA) o esposte a 10 minuti d'irraggiamento (UVA) e in cellule 2 h dopo l'esposizione. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM, n = 3. Lettere diverse indicano differenze statistiche tra i campioni (test di confronto multiplo post-hoc di Tukey,  $p < 0,05$ ).

### **5.3 L'effetto dell'esposizione a raggi UVA in cellule HDF: analisi dell'espressione di PON2 a diversi time point post-irraggiamento**

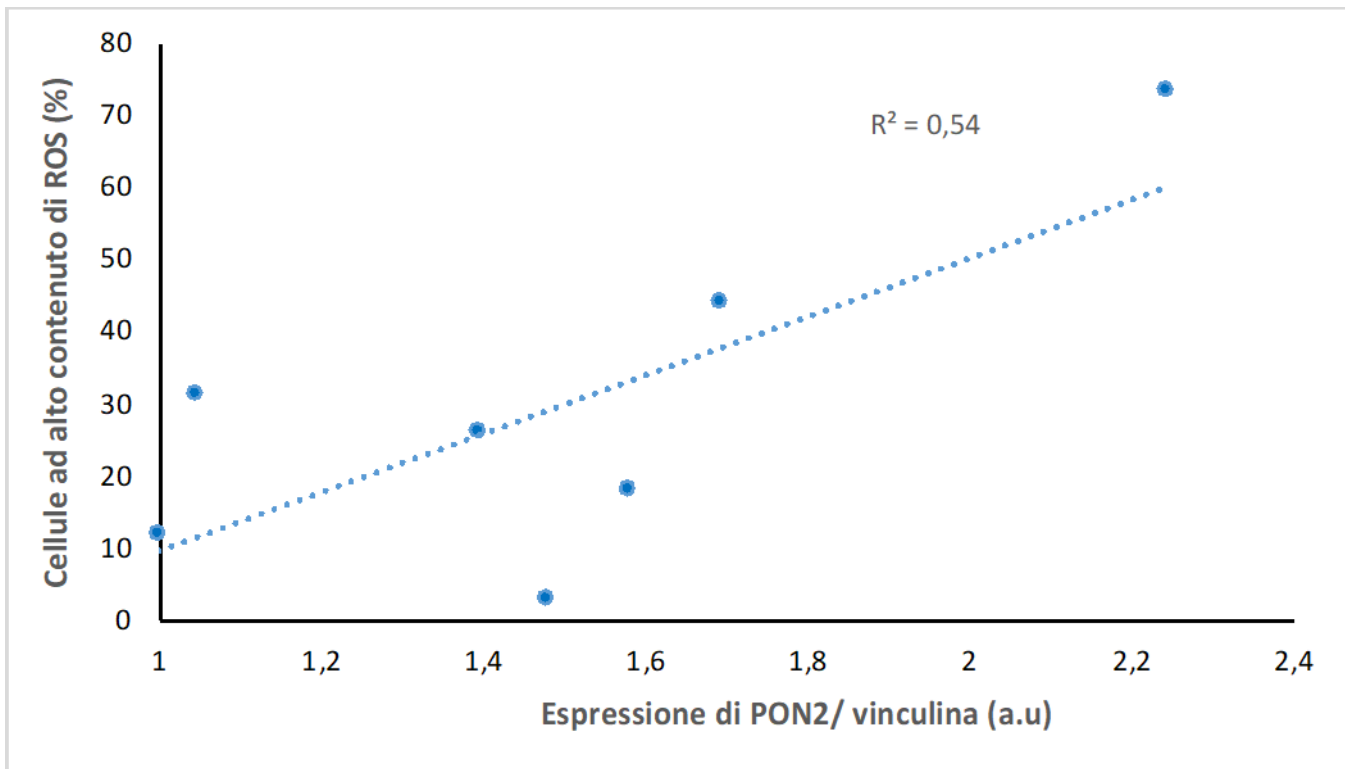
Come descritto precedentemente, l'esposizione delle cellule HDF ai raggi UVA modula l'espressione di PON2, abbiamo quindi voluto investigare l'andamento dell'espressione di questo enzima anche nella fase post-irraggiamento. A tale scopo i livelli di PON2 sono stati valutati mediante Western Blott nelle cellule esposte 10 minuti a UVA e dopo 2h, 4h, 24h dall'esposizione.

La **figura 29** mostra l'analisi densitometrica dei livelli dell'enzima PON2 nelle cellule trattate nelle diverse condizioni sperimentali. Come descritto precedentemente, l'esposizione delle cellule HDF per 10 minuti ai raggi UVA induce un aumento dell'espressione di PON2. Nella fase post-irraggiamento di osserva una graduale diminuzione dei livelli di PON2, dopo 24 h dall'esposizione i livelli tornano a quelli di osservati nelle cellule non trattate. Una relazione è stata osservata tra i livelli di PON2 e la formazione di ROS intracellulare. Come mostrato nella **figura 30**, una correlazione positiva è stata stabilita tra i livelli di PON2 e la percentuale di cellule ad alto contenuto di ROS in cellule HDF trattate nelle diverse condizioni sperimentali ( $r=0,73$ ,  $p<0.05$ ).

*Come descritto nella parte introduttiva della tesi, PON2 svolge un ruolo antiossidante e anti-apoptotico, pertanto sulla base dei dati ottenuti, è possibile ipotizzare che l'aumento dell'espressione dei livelli di PON2 rappresenti uno dei meccanismi di difesa e di riparo messi in atto dalle cellule a seguito del trattamento con UVA e che l'aumento dei ROS svolge un ruolo chiave nel controllo dell'espressione cellulare di PON2 nelle cellule HDF.*



**Figura 29.** Espressione di PON2 a diversi time point: Analisi densitometrica dell'espressione di PON2 in cellule in cellule HDF non irraggiate (NO UVA) o esposte a 10 minuti d'irraggiamento (UVA) e in cellule dopo 2 h, 4 h e 24 h dall'esposizione. I dati sono normalizzati con Vinculina ed espressi come media  $\pm$  SD, n = 3. Lettere diverse indicano differenze statistiche tra i campioni (test di confronto multiplo post-hoc di Tukey,  $p < 0,05$ )



**Figura 30.** Relazione tra livelli di PON2 e produzione intracellulare di ROS.

Relazione tra livelli di PON2 e percentuale di cellule ad alto contenuto di ROS in cellule HDF trattate nelle diverse condizioni sperimentali.

## **5.4 L'effetto della crema solare sull'esposizione a raggi UVA in cellule HUDE: analisi della citotossicità e espressione di PON2**

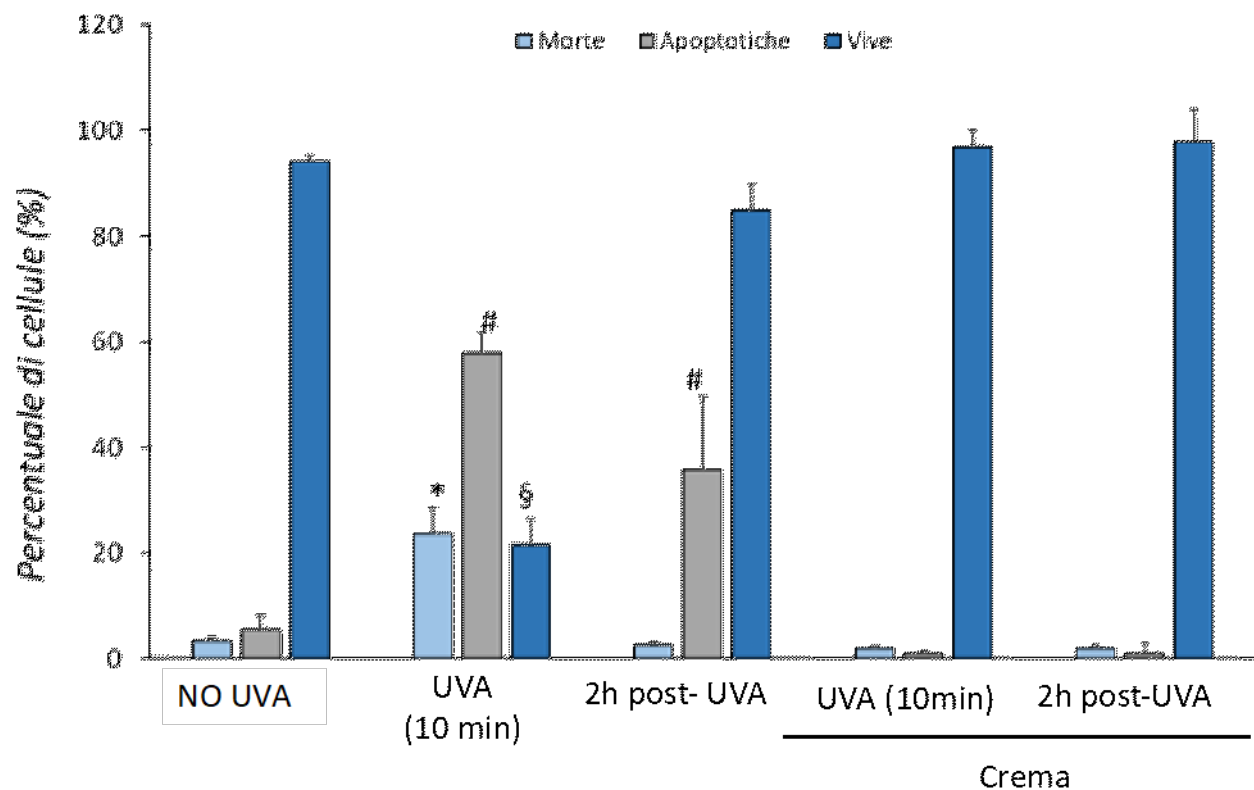
Nel presente lavoro di tesi è stata valutata l'effetto protettivo dai danni indotti dall'esposizione ai raggi UVA di una crema solare. A tale scopo la vitalità cellulare, i livelli di ROS intracellulare, i livelli di AGEs e i livelli di PON2 sono stati valutati in cellule HDF esposte per 10 minuti a UVA in presenza di crema solare con SPF di 30 e dopo 2 ore dall'esposizione e confrontati con quelli osservati nelle cellule non schermate.

L'analisi citofluorimetrica della vitalità cellulare mostra che la crema è in grado di preservare la vitalità cellulare. Come riportato nella *figura 31*, nelle cellule irraggiate per 10 minuti in presenza di crema, si assiste ad un aumento significativo della vitalità cellulare (circa 80%) rispetto alle cellule irraggiate senza crema. Allo stesso tempo, la percentuale di cellule morte e apoptotiche sono simili a quelli osservati nelle cellule non irraggiate. La crema mostra un effetto protettivo anche nella condizione di recupero post irraggiamento. Come mostrato in *figura 31*, in presenza di crema, dopo 2 ore i valori di vitalità sono simili a quelli osservati nelle cellule non irraggiate.

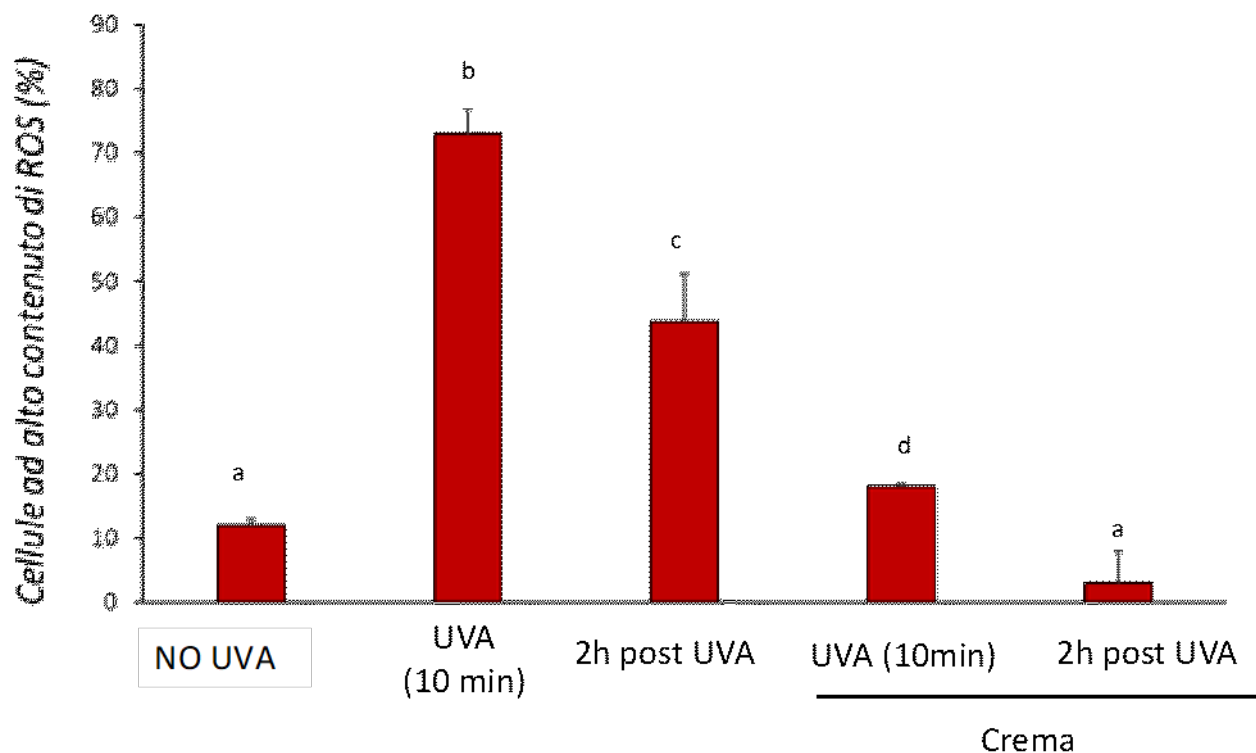
Parallelamente alla vitalità cellulare, la presenza della crema ha ridotto l'aumento della percentuale di cellule con un alto contenuto di ROS in seguito all'esposizione per 10 minuti ai raggi UVA ( $p < 0,05$ ) (*Figura 32*). La presenza della crema porta ad una diminuzione dei livelli di ROS intracellulari anche dopo le 2h dall'esposizione, infatti la percentuale di cellule con un alto contenuto di ROS si riduce e i valori sono simili a quelli osservati nelle cellule non irraggiate.

La presenza della crema mostra un effetto protettivo anche nei confronti della glicazione non enzimatica delle proteine. Come mostrato nella *figura 33* una diminuzione significativa dei livelli di GA-proteins si osservano nelle HFD irraggiate in presenza di crema rispetto alle cellule non schermate.

Come mostrato nella *figura 34* la presenza di crema riduce significativamente l'aumento di PON2 indotto dall'esposizione di UVA. L'espressione dell'enzima PON2 in presenza di crema solare è significativamente ridotta di circa 1,9 volte ( $p < 0,05$ ). Dopo due ore dall'esposizione i livelli di enzima risultano essere significativamente più bassi rispetto a quelle delle cellule non irraggiate ( $p < 0,05$ ).



**Figura 31.** Effetto della crema solare sulla citotossicità indotta da esposizione a UVA: Percentuale (%) di cellule morte, apoptotiche e vive in cellule HFD non irraggiate (NO UVA) o esposte a 10 minuti d'irraggiamento (UVA) e successivo recupero (2 h) in presenza ed in assenza di crema solare. I dati sono espressi come media  $\pm$ SEM, n = 3. Lettere diverse indicano differenze statistiche tra i campioni (test di confronto multiplo post-hoc di Tukey,  $p < 0,05$ ).

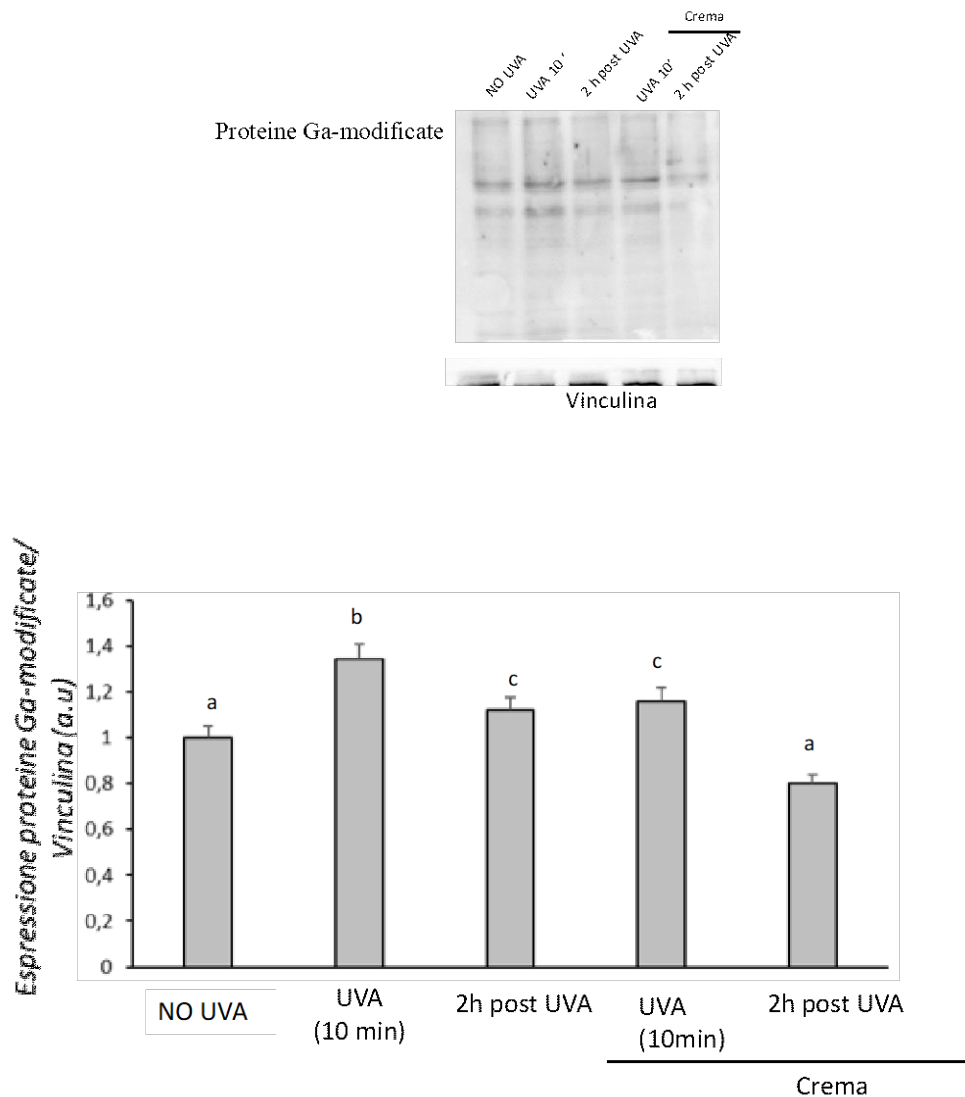


**Figura 32.** Effetto della crema solare sulla formazione di ROS indotta da esposizione a UVA: Percentuale (%) di cellule ad alto contenuto di ROS in cellule Hude non irraggiate (NO UVA) o esposte a 10 minuti d'irraggiamento (UVA) e successivo recupero (2 h) in presenza ed in assenza di crema solare.

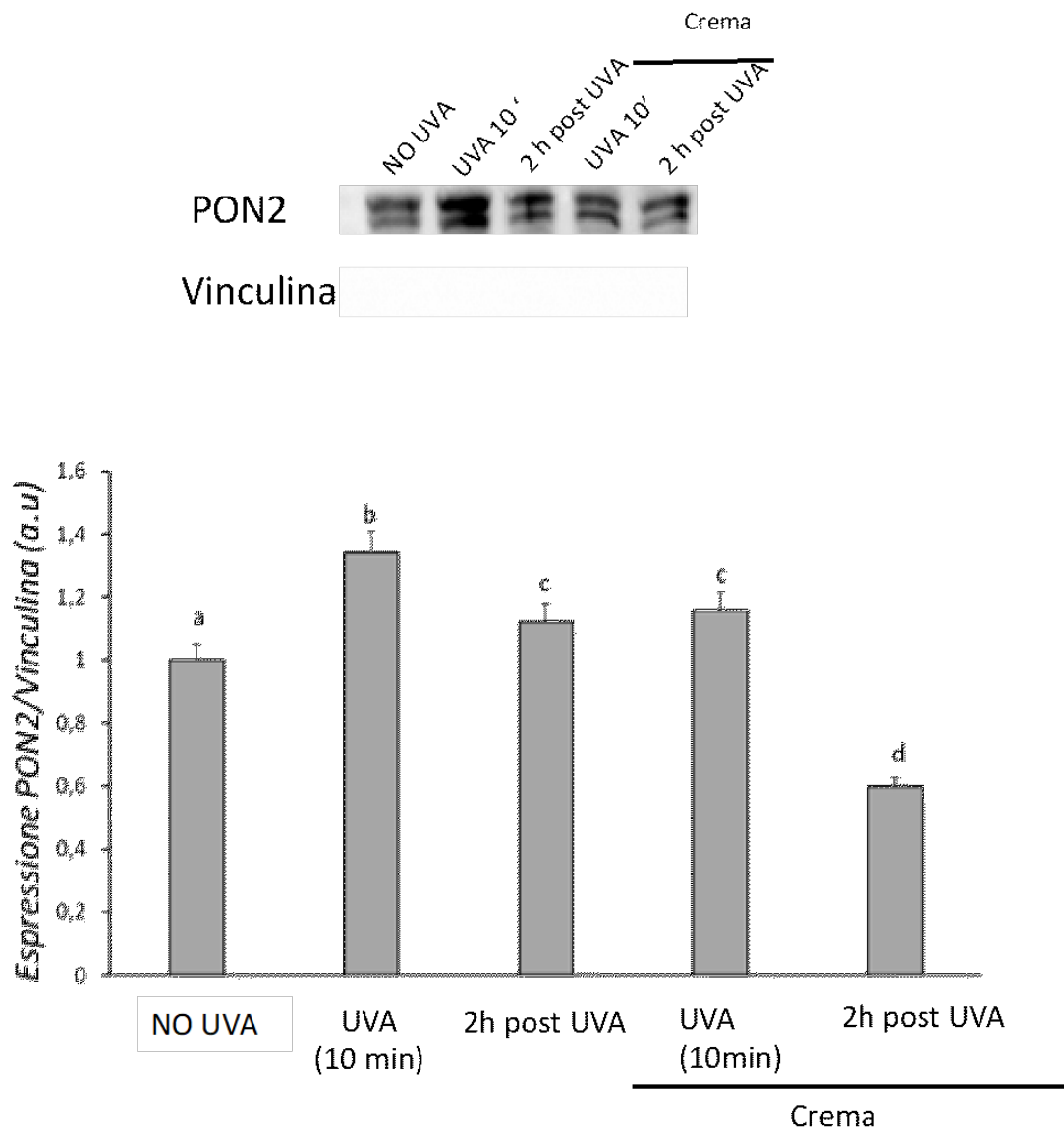
I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM, n = 3. Lettere diverse indicano differenze statistiche tra i campioni (test di confronto multiplo post-hoc di

Tukey,  $p < 0,05$ ).





**Figura 33.** Espressione di proteine GA-modificate post- irraggiamento in presenza ed in assenza di crema solare: Analisi densitometrica dell'espressione di proteine GA-modificate in cellule HFD non irraggiate (NO UVA) o esposte a 10 minuti d'irraggiamento (UVA) e successivo recupero (2 h) in presenza ed in assenza di crema solare. I dati sono normalizzati con Vinculina ed espressi come media  $\pm$  SD, n = 3. Lettere diverse indicano differenze statistiche tra i campioni (test di confronto multiplo post-hoc di Tukey,  $p < 0,05$ ).



**Figura 34.** Espressione di PON2 post-irraggiamento in presenza ed in assenza di crema solare: Analisi densitometrica dell'espressione di PON2 in cellule HUDE non irraggiate (NO UVA) o esposte a 10 minuti d'irraggiamento (0 h) e successivo recupero (2 h) in presenza ed in assenza di crema solare. I dati sono normalizzati con Vinculina ed espressi come media  $\pm$  SD, n = 3. Lettere diverse indicano differenze statistiche tra i campioni (test di confronto multiplo post-hoc di Tukey,  $p < 0,05$ ).

## CONCLUSIONI

È noto che le cellule del derma sono quelle più esposte agli insulti fisici, ambientali, e biologici, tra i quali l'esposizione alla radiazione ultravioletta che possono indurre risposte biologiche che portano a danni cellulari attraverso la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS).

Sebbene la radiazione UVC sia quella potenzialmente più dannosa per i sistemi biologici, questa viene tuttavia efficacemente filtrata dallo strato di ozono. Al contrario i raggi UVA e UVB non vengono schermati. I raggi UVA costituiscono la maggior componente ultravioletta che arriva sulla terra (il 90-95% della radiazione UV totale), essi sono in grado di penetrare nel derma dove risiedono i fibroblasti e di indurre il danno cellulare attraverso la generazione di ROS, e attraverso la fotoeccitazione di fotosensibilizzatori endogeni che sono in grado di ossidare molteplici componenti cellulari come carboidrati, lipidi, proteine e DNA. Pertanto, l'intensa o eccessiva esposizione ai raggi UVA porta a ustioni solari, eritema, infiammazione, iperpigmentazione, rughe, iperplasia, fotoinvecchiamento e fotocarcinogenesi. La correlazione tra l'esposizione alla luce solare e l'insorgenza di tumori cutanei ha portato nel 2009 l'International Agency for Research on Cancer (IARC) a classificare le radiazioni solari tra i cancerogeni di Classe I.

Le cellule del derma, tuttavia, possiedono vari meccanismi di difesa e di riparo endogeni che concorrono a proteggere il danno ossidativo mediato da UV e a mantenere l'integrità cellulare, tra questi l'enzima Paraonasi-2 (PON2). PON2 è un membro della famiglia delle Paraonasi. È un enzima intracellulare e ubiquitario. Un'ampia letteratura scientifica supporta un ruolo protettivo di PON2 contro lo stress ossidativo e la perossidazione lipidica [1]. Fattori genetici e ambientali sono in grado di influenzare l'espressione e l'attività di PON2.

Pertanto, lo scopo della presente tesi è stato investigare l'effetto dell'esposizione a raggi UVA sull'espressione di PON2 utilizzando fibroblasti di derma umano, come modello cellulare. Le cellule sono state esposte a raggi UVA per 10 minuti, equivalente a circa 180 kJ/m<sup>2</sup>, una dose che approssimativamente equivale a circa 60 minuti di esposizione al sole nella riviera francese (Nizza) in estate a mezzogiorno. Il foto-danno e la variazione dell'espressione di PON2 sono stati valutati in funzione del tempo post-irraggiamento (0, 2, 4 e 24 ore). Lo studio è stato condotto in presenza di una crema solare contenenti filtri chimici con spf 30.

Nel presente lavoro di tesi il foto-danno è stato quantificato in termini di vitalità cellulare, di livelli intracellulari di specie reattive dell'ossigeno (ROS).

Lo studio della vitalità cellulare mediante citometria, che ha messo in evidenza una significativa diminuzione della percentuale di cellule vitali e un significativo aumento della percentuale di cellule apoptotiche e morte dopo esposizione per 10 minuti rispetto alle cellule non irraggiate. La percentuale di cellule vive aumenta gradualmente nella fase post-irraggiamento. Le cellule irraggiate per 10 minuti mostrano anche un significativo aumento dei livelli di ROS che nella fase post-irraggiamento tendono a diminuire senza però mai tornare ai livelli osservati nelle cellule non trattate.

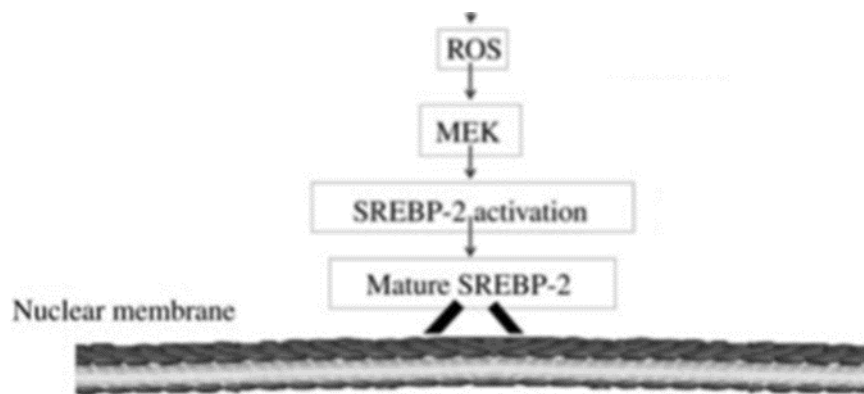
Questi dati confermano che i ROS rappresentano i mediatori chiave degli effetti biologici indotti dai raggi UVA. Tale aumento a livello intracellulare è in grado di attivare processi fisiologici di morte cellulare, inclusa l'apoptosi, che si verifica in una varietà di condizioni fisiologiche e in risposta a molti agenti citotossici. L'induzione dell'apoptosi in seguito all'esposizione ai raggi UV sembra essere un meccanismo protettivo, perché consente di eliminare le cellule gravemente danneggiate che comportano il rischio di trasformazione maligna. L'apoptosi mediata dai raggi UV è un processo estremamente

complesso in cui sono coinvolti diversi percorsi molecolari. Questi includono danni al DNA, attivazione del gene soppressore del tumore p53, attivazione dei recettori della morte cellulare direttamente tramite UV o mediante rilascio autocrino di ligandi di morte, danno mitocondriale e rilascio di citocromo C [115]. Inoltre, il danno ossidativo indotto dai raggi UVA mediato dall'aumentata formazione di ROS ha conseguenze sia a livello molecolare che cellulare [116].

Diversi studi hanno investigato l'effetto di UV sui meccanismi di difesa antiossidante delle cellule del derma, ma nessuno studio, ad oggi, è stato condotto al fine di valutare l'effetto dell'esposizione sulla PON2. I dati ottenuti nella presente evidenziano che il foto-danno indotto dall'esposizione a UVA è associato ad un aumento significativo dell'espressione di PON2, l'espressione di PON2 infatti aumenta di circa 2 volte nelle cellule dopo esposizione per 10 minuti rispetto alle cellule non irraggiate. L'espressione di PON2 tende a diminuire nella fase post-irraggiamento, ma anche dopo 24 h si osserva una maggiore espressione rispetto al controllo. Una correlazione positiva è possibile osservare tra l'espressione di PON2 e i livelli di ROS intracellulare. Come descritto nella parte introduttiva della tesi, PON2 a livello cellulare svolge un ruolo antiossidante e anti-apoptotico, pertanto, è possibile ipotizzare che l'aumentata espressione di PON2 nelle cellule irraggiate possa rappresentare un meccanismo di difesa messo in atto dalla cellula per limitare il foto-danno e sfuggire all'apoptosi. Questi dati sono in accordo con studi precedenti. Recentemente un aumento dose-dipendente di PON2 è stato osservato in cheratinociti esposti a dosi crescenti di raggi UVA a 385nm (0-200J/cm<sup>2</sup>). L'aumentata espressione di PON2 era associata ad un aumento della morte cellulare e dei livelli intracellulari di ROS ((The UV/Visible Radiation Boundary Region (385–405 nm) Damages Skin Cells and Induces “dark”

Cyclobutane Pyrimidine Dimers in Human Skin in vivo). Inoltre, un aumento dell'espressione di PON2 è stato osservato in macrofagi esposti a stress ossidativo [78].

Per quanto riguarda i meccanismi molecolari è stato suggerito che i ROS attivino ERK1/2 che stimola la fosforilazione di sterol regulatory binding protein-2 (SREBP-2). SREBP-2 può quindi translocare nel nucleo e legarsi ai transcriptional regulatory elements (TRE) PON2 e quindi promuovere la sua espressione [117].



Lo studio è stato condotto anche in presenza di una crema solare contenenti filtri chimici con spf 30. A tale scopo una determinata quantità di crema è stata spalmata su vetrini, perfettamente combacianti con i pozzetti delle piastre contenenti le cellule e successivamente irraggiate. I risultati ottenuti hanno dimostrato che se i raggi UVA sono schermati da uno strato di crema solare, presente sopra le cellule, ma non a contatto con esse, come nel modello sperimentale qui utilizzato, i parametri relativi al danno sono influenzati positivamente. I risultati ottenuti nel nostro studio hanno dimostrato un aumento delle cellule vive, una diminuzione delle cellule apoptotiche e una minore formazione di ROS intracellulare nelle cellule irraggiate in presenza di crema solare rispetto alle cellule trattate in assenza di crema. Il minor danno osservato nelle cellule trattate in presenza di crema è associato anche ad una minore espressione di PON2 rispetto alle cellule irraggiate senza crema, confermando lo stretto rapporto tra ROS e PON2.

In conclusione, i dati ottenuti dimostrano per la prima volta che le radiazioni UVA sono in grado di modulare l'espressione di PON2 con un meccanismo che vede coinvolto la formazione di ROS intracellulari. Questo studio rappresenta un interessante punto di partenza per le indagini future. Ulteriori studi saranno di particolare interesse, al fine di confermare i nostri risultati, per esplorare i meccanismi molecolari coinvolti nella regolazione dell'espressione PON2 da parte dei raggi ultravioletti.

## Riferimenti

- [1] C. J. Ng, D. J. Wadleigh, A. Gangopadhyay, S. Hama, V. R. Grijalva, M. Navab, A. M. Fogelman e S. T. Reddy, «Paraoxonase-2 Is a Ubiquitously Expressed Protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein,» *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, vol. 276, n. 48, p. 44444–44449, 2001.
- [2] R. L. Gallo, «Human Skin Is the Largest Epithelial Surface for Interaction with Microbes,» *J Invest Dermatol*, vol. 137, n. 6, pp. 1213-1214, 2017.
- [3] T. d. P. Jager, A. Cockrell e S. Du, «Ultraviolet Light Induced,» *Ultraviolet Light in Human Health, Diseases and Environment, Advances in Experimental Medicine and Biology 996*, 2017.
- [4] N. L. Bragazzi, M. Sellami, I. Salem, R. Conic, M. Kimak, P. D. M. Pigatto e G. Damiani, «Fasting and Its Impact on Skin Anatomy, Physiology, and Physiopathology: A Comprehensive Review of the Literature,» *Nutrients*, vol. 11(2), n. 249, 2019.
- [5] «Timeless Beauty,» [Online]. Available: <https://www.timelessbeauty.it/makeupatlas/derma-e-ipoderma/>.
- [6] «Ink me,» [Online]. Available: <https://inkme.it/strati-della-pelle/>.
- [7] M. Roger, N. Fullard, L. Costello, S. Bradbury, E. Markiewicz, S. O'Reilly, N. Darling, P. Ritchie, A. Maatta, I. Karakesisoglou, G. Nelson, T. V. Zglinicki, T. Dicolandrea, R. Isfort e C. Bascom, «Bioengineering the microanatomy of human skin,» *Journal of Anatomy*, vol. 234, pp. 438-455, 2019.
- [8] G. Anastasi, S. Capitani, M. L. Carnazza, S. Cinti, R. D. Caro, R. F. Donato, V. F. Ferrario, L. Fonzi e A. T. F. Eugeni, *Trattato di Anatomia Umana*, Edi. Ermes, 2012.
- [9] S. Werner, T. Krieg e H. Smola, «Keratinocyte–Fibroblast Interactions in Wound Healing,» *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 127, pp. 998-1008, 2007.



- [10] «Wikipedia,» [Online]. Available: [https://it.wikipedia.org/wiki/Cellula\\_di\\_Langerhans#Funzione](https://it.wikipedia.org/wiki/Cellula_di_Langerhans#Funzione).
- [11] H. Lodish, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore e J. Darnell, *Molecular Cell Biology*. 4th edition, New York: W. H. Freeman, 2000.
- [12] «Antirughe.info,» [Online]. Available: <https://www.antirughe.info/pelle/ipoderma.html>.
- [13] D. W. Shin, «Various biological effects of solar radiation on skin and their mechanisms: implications for phototherapy,» *ANIMAL CELLS AND SYSTEMS*, vol. 24, n. 4, pp. 181-188, 2020.
- [14] [Online]. Available: [https://www.bing.com/images/search?view=detailV2&ccid=%2ftWAC7FS&id=0C6E4E06DDA9D99E8ACF63D0D6C2DFF627FC78F4&thid=OIP.\\_tWAC7FSuOpqDCmR1k1YogHaD-&mediaurl=https%3a%2f%2fwww.supermeteo.com%2fwp-content%2fuploads%2f2018%2f02%2fSenzanome-30.png&cdnurl=https%3](https://www.bing.com/images/search?view=detailV2&ccid=%2ftWAC7FS&id=0C6E4E06DDA9D99E8ACF63D0D6C2DFF627FC78F4&thid=OIP._tWAC7FSuOpqDCmR1k1YogHaD-&mediaurl=https%3a%2f%2fwww.supermeteo.com%2fwp-content%2fuploads%2f2018%2f02%2fSenzanome-30.png&cdnurl=https%3).
- [15] K. J. G. Kępką, A. P. Jakubik, R. M. Żukowska e K. Socha, «The impact of ultraviolet radiation on skin photoaging,» *Journal of Cosmetic Dermatology*, vol. 00, pp. 1-5, 2021.
- [16] «My Personal Trainer,» [Online]. Available: <https://www.my-personaltrainer.it/bellezza/abbronzatura/abbronzatura-U-V.html>.
- [17] J. D'Orazio, S. Jarrett, A. A. Ortiz e T. Scott, «UV Radiation and the Skin,» *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 14, pp. 12222-12248, 2013.
- [18] A. Sample e Y. Y. He, «Autophagy in UV damage response,» *Photochem Photobiol*, vol. 93, n. 4, p. 943–955, 2017.
- [19] A. Bowie e L. A. O'Neill, «Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries,» *Biochem Pharmacol*, vol. 59, n. 1, pp. 13-23, 2000.
- [20] D. N. Syed, F. Afaq e H. Mukhtar, «Differential activation of signaling pathways by UVA and UVB radiation in normal human epidermal keratinocytes,» *Photochemistry and Photobiology*, vol. 88, n. 5, pp. 1184-1190, 2012.

- [21] Y. Lan, Y. Wang e H. Lu, «Opsin 3 is a key regulator of ultraviolet A-induced photoaging in human dermal fibroblast cells,» *British Journal of Dermatology*, vol. 182, pp. 1228-1244, 2020.
- [22] M. Rinnerthaler, J. Bischof, M. C. Streubel e A. Trost, «Oxidative Stress in Aging Human Skin,» *Biomolecules*, vol. 5, pp. 545-589, 2015.
- [23] G. I. Harrison e A. R. Young, «Ultraviolet radiation-induced erythema in human skin,» *Methods*, vol. 28, n. 1, pp. 14-19, 2002.
- [24] «Buckhead plastic surgery,» [Online]. Available: <https://buckheadplasticsurgery.com/fitzpatrick-skin-types-and-how-lux-can-help-with-moxi/>.
- [25] K. Vercruyse, A. Clark, N. Alatas, D. Brooks, N. Hamza e M. Whalen, «Polysaccharide-mediated synthesis of melanins from serotonin and other 5-hydroxy indoles,» *Future Science OA*, vol. 4, n. 3, 2018.
- [26] K. C. Guerra, K. Urban e J. S. Crane, Sunburn, StatPearls, 2020.
- [27] J. W. Lee, K. Ratnakumar, K.-F. Hung, Kawasumi e D. Rokunohe, «Deciphering UV-induced DNA Damage Responses to Prevent and Treat Skin Cancer,» *Photochem Photobiol*, vol. 96, n. 3, pp. 478-499, 2020.
- [28] C. Orlando, F. A. Roldán, C. Varelli, R. Bard e A. C. a. X. Wortsman, «Skin cancer: findings and role of high-resolution ultrasound,» *J Ultrasound*, vol. 22, n. 4, pp. 423-431, 2019.
- [29] «Wikipedia,» [Online]. Available: [https://it.wikipedia.org/wiki/Carcinoma\\_basocellulare](https://it.wikipedia.org/wiki/Carcinoma_basocellulare).
- [30] «Skin Therapy Letter,» [Online]. Available: <https://www.skintherapyletter.com/skin-cancer/melanoma/>.
- [31] J. C. S. Yam e A. K. H. Kwok, «Ultraviolet light and ocular diseases,» *International Ophthalmology*, vol. 34, pp. 383-400, 2014.
- [32] S. Schalka, D. Steiner, F. N. Ravelli e T. Steiner, «Brazilian Consensus on Photoprotection,» *ANAIS BRASILEIROS DE DERMATOLOGIA*, vol. 89, n. 6, pp. 1-74, 2014.

- [33] C. Battie, S. Jitsukawa, F. Bernerd, S. D. Bino, C. Marionnet e M. Verschoore, «New insights in photoaging, UVA induced damage and skin types,» *Exp Dermatol*, 2014.
- [34] H. Yamaba, M. Haba, M. Kunita, T. Sakaida, H. Tanaka, Y. Yashiro e S. Nakata, «Morphological change of skin fibroblasts induced by UV Irradiation is involved in photoaging,» *Experimental Dermatology*, vol. 25, n. 3, pp. 45-51, 2016.
- [35] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. D. Cronin, M. Mazur e J. Telser, «Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease,» *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 39, pp. 44-84, 2007.
- [36] S. E. Tweedy, A. R. Benítez, A. R. H. Narayan, P. M. Zimmerman, C. L. Brooks e T. Wymore, «The Hydroxyl Radical Coupled Electron Transfer Mechanism of Flavin-Dependent Hydroxylases,» *J Phys Chem B.*, vol. 123, n. 38, p. 8065–8073, 2019.
- [37] «Wikimedia Commons,» [Online]. Available: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lipid\\_peroxidation-es.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lipid_peroxidation-es.svg).
- [38] Y. C. Hseu, C. W. Chou, K. J. S. Kumar, K. T. Fu, H. M. Wang, L. S. Hsu, Y. H. Kuo, C. R. Wu, S. C. Chen e H. L. Yang, «Ellagic acid protects human keratinocyte (HaCaT) cells against UVA-induced oxidative stress and apoptosis through the upregulation of the HO-1 and Nrf-2 antioxidant genes,» *Food and Chemical Toxicology*, vol. 50, n. 5, pp. 1245-1255, 2012.
- [39] C. Chavez, G. C. Becerra, J. Fei, G. A. Kassavetis e J. T. Kadonaga, «The tardigrade damage suppressor protein binds to nucleosomes and protects DNA from hydroxyl radicals,» *eLife*, vol. 8, 2019.
- [40] U. Panich, G. Sittithumcharee, N. Rathviboon e S. Jirawatnotai, «Ultraviolet Radiation-Induced Skin Aging: The Role of DNA Damage and Oxidative Stress in Epidermal Stem Cell Damage Mediated Skin Aging,» *Stem Cells International*, 2016.
- [41] «Wikipedia,» [Online]. Available: [https://it.wikipedia.org/wiki/Stress\\_ossidativo](https://it.wikipedia.org/wiki/Stress_ossidativo).
- [42] M. H. Lima, «Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals,» in *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*, 2004, pp. 319-368.

- [43] B. Griess, E. Tom, F. Domann e M. T. Fitzgerald, «Extracellular Superoxide Dismutase and its Role in Cancer,» *Free Radic Biol Med*, vol. 112, pp. 464-479, 2017.
- [44] B. Chen, Z. Shen, D. Wu, X. Xie, X. Xu, L. Lv, H. Dai e J. C. a. X. Gan, «Glutathione Peroxidase 1 Promotes NSCLC Resistance to Cisplatin via ROS-Induced Activation of PI3K/AKT Pathway,» *BioMed Research International*, vol. 7640547, 2019.
- [45] D. Xu, Y. Li, X. Meng, T. Zhou, Y. Zhou, J. Zheng, J. J. Zhang e H. B. Li, «Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources,» *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 18, n. 96, 2017.
- [46] M. G. Rajkovic, L. Rumora e K. Barisic, «The paraoxonase 1, 2 and 3 in humans.,» *Biochimica Medica*, vol. 21, n. 2, pp. 122-30, 2011.
- [47] P. Palmo, R. C. Sorenson, J. Teiber e L. Du, «The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family.,» *Genomics*, vol. 33, n. 3, pp. 498-507, 1996.
- [48] R. Sorenson, P. Palmo, S. A. Camper e B. N. L. Du, «The genetic mapping and gene structure of mouse paraoxonase/arylesterase.,» *Genomics*, vol. 30, pp. 431-438, 1995.
- [49] D. I. Draganov, J. F. Teiber, A. Speelman, Y. Osawa, R. Sunahara e B. N. L. Du, «Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities,» *Journal of Lipid Research*, vol. 46, n. 6, pp. 1239-1247, 2005.
- [50] N. Shunmoogam, P. Naidoo e R. Chilton, «Paraoxonase (PON)-1: a brief overview on genetics, structure, polymorfisms and clinical relevance,» *Vascular Health and Risk Management*, vol. 14, pp. 137-143, 2018.
- [51] C. E. Furlong, J. Marsillach, P. G. Jarvik e L. G. Costa, «Paraoxonases-1, -2 and -3: What are their Functions?,» *Chem Biol Interact*, vol. 259(Pt B), p. 51-62, 2016.
- [52] S. T. Furlong e J. P. Caulfield, «Schistosoma mansoni: synthesis and release of phospholipids, lysophospholipids, and neutral lipids by schistosomula,» *Exp Parasitol*, vol. 69, n. 1, pp. 65-77, 1989.
- [53] A. Weiss e P. T. Costa, «Domain and facet personality predictors of all-cause mortality among Medicare patients aged 65 to 100,» *Psychosom Med*, vol. 67, n. 5, pp. 724-733, 2005.

- [54] M. Mackness e B. Mackness, «Human paraoxonase-1 (PON1): Gene structure and expression, promiscuous activities and multiple physiological roles,» *Gene*, vol. 567, n. 1, pp. 12-21, 2015.
- [55] J. VanLimbergen, R. K. Russell, H. E. Drummond, M. C. Aldhous, N. K. Round, E. R. Nimmo, L. Smith, P. M. Gillett, P. McGrogan, L. T. Weaver, W. M. Bisset, G. Mahdi, I. D. Arnott, J. Satsangi e D. C. Wilson, «Definition of phenotypic characteristics of childhood-onset inflammatory bowel disease,» *Gastroenterology*, vol. 135, n. 4, pp. 1114-1122, 2008.
- [56] H. B. Senturk, J. Choi, E. Oral, J. H. Kung, C. E. Macias, G. Braithwaite e O. K. Muratoglu, «The effect of polyethylene glycol on the stability of pores in polyvinyl alcohol hydrogels during annealing,» *Biomaterials*, vol. 29, n. 2, pp. 141-149, 2008 .
- [57] A. Ferretti, F. Novali, R. Bürgmann, G. Hilley e C. Prati, «InSAR permanent scatterer analysis reveals ups and downs in San Francisco Bay area,» *Trans. Am. Geophys. Union*, vol. 85, n. 34, pp. 317-324, 2004.
- [58] M. Mackness, S. Arrol e P. N. Durrington, «Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein,» *FEBS Lett*, vol. 286, n. 1-2, pp. 152-154, 1991.
- [59] S. Horke, I. Witte, P. Wilgenbus, M. Krüger, D. Strand e U. Förstermann, «Paraoxonase-2 Reduces Oxidative Stress in Vascular Cells and Decreases Endoplasmic Reticulum Stress–Induced Caspase Activation,» *Circulation*, vol. 115, n. 15, pp. 2055-2064, 2007.
- [60] G. Manco, E. Porzio e T. M. Carusone, «Human Paraoxonase-2 (PON2): Protein Functions and Modulation,» *Antioxidants*, vol. 10, n. 256, 2021.
- [61] A. Devarajan, N. Bourquard, S. Hama, M. Navab, V. R. Grijalva, S. Morvardi, C. F. Clarke, L. Vergnes, K. Reue, J. F. Teiber e S. T. Reddy, «Paraoxonase 2 Deficiency Alters Mitochondrial Function,» *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING*, vol. 14, n. 3, pp. 341-351, 2011.
- [62] S. Porntadavity, T. Permpongpaiboon e W. Sukketsiri, «HUMAN PARAOXONASE 2,» *EXCLI Journal*, vol. 9, pp. 159-172, 2010.
- [63] T. Bacchetti, E. Salvolini, V. Pompei, R. Campagna, E. Molinelli, V. Brisigotti, L. Togni, G. Lucarini, D. Sartini, A. Campanati, M. Mattioli-Belmonte, C. Rubini, G. Ferretti, A. Offidani

e M. Emanuelli, «Paraoxonase-2: A potential biomarker for skin cancer,» *John Wiley & Sons Ltd*, 2020.

- [64] R. Shamir, C. Hartman, R. Karry, E. Pavlotzky, R. Eliakim, J. Lachter, A. Suissa e M. Aviram, «Paraoxonases (PONs) 1, 2, and 3 are expressed in human and mouse gastrointestinal tract and in Caco-2 cell line: Selective secretion of PON1 and PON2,» *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 39, n. 3, pp. 336-344, 2005.
- [65] L. Rothem, C. Hartman, A. Dahan, J. Lachter, R. Eliakim e R. Shamir, «Paraoxonases are associated with intestinal inflammatory diseases and intracellularly localized to the endoplasmic reticulum,» *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 43, n. 5, pp. 730-739, 2007.
- [66] J. P. Kehrer e L. O. Klotz, «Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for Health,» *Critical Reviews in Toxicology*, vol. 45, n. 9, pp. 765-798, 2015.
- [67] G. Giordano, T. B. Cole, C. E. Furlong e L. G. Costa, «Paraoxonase 2 (PON2) in the mouse central nervous system: a neuroprotective role?,» *Toxicology and applied pharmacology*, vol. 256, n. 3, pp. 369-378, 2011.
- [68] B. Mackness, M. Mackness, S. Arrol, W. Turkie e P. N. Durrington, «Effect of the human serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification,» *Febs Letters*, vol. 423, n. 1, pp. 57-60, 1998.
- [69] H. Hagmann, A. Kuczkowski, M. Ruehl, T. Lamkemeyer, S. Brodesser, S. Horke, S. Dryer, B. Schermer, T. Benzing e P. T. Brinkkoetter, «Breaking the chain at the membrane: paraoxonase 2 counteracts lipid peroxidation at the plasma membrane,» *The FASEB Journal*, vol. 28, n. 4, pp. 1769-1779, 2014.
- [70] S. Barathi, M. Charanya, S. Muthukumar, N. Angayarkanni e V. Umashankar, «Comparative modeling of PON2 and analysis of its substrate binding interactions using computational methods,» *Journal of Ocular Biology, Diseases, and Informatics*, vol. 3, n. 2, pp. 64-72, 2010.

- [71] D. A. Stoltz, E. A. Ozer, T. J. Recker, M. Estin, X. Yang, D. M. Shih, A. J. Lusis e J. Zabner, «A common mutation in paraoxonase-2 results in impaired lactonase activity,» *Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, n. 51, pp. 35564-35571, 2009.
- [72] J. F. Teiber, S. Horke e D. C. Haines, «Dominant role of paraoxonases in inactivation of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone,» *Infections and immunity*, vol. 76, n. 6, pp. 2512-2519, 2008.
- [73] S. Horke, I. Witte e S. Altenhofer, «Paraoxonase 2 is down-regulated by the *Pseudomonas aeruginosa* quorumsensing signal N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone and attenuates oxidative stress induced by pyocyanin,» *The Biochemical Journal*, vol. 426, n. 1, pp. 73-83, 2010.
- [74] L. P. Précourt, D. Amre, M. C. Denis, J. C. Lavoie, E. Delvin, E. Seidman e E. Levy, «The three-gene paraoxonase family: Physiologic roles, actions and regulation,» *Atherosclerosis*, vol. 214, n. 1, pp. 20-36, 2011.
- [75] A. D. D. M. e. a. Precourt LP, «The three-gene paraoxonase family: physiologic roles, actions and regulation,» *Atherosclerosis*, vol. 214, n. 1, pp. 20-36, 2011.
- [76] C. J. Ng, N. Bourquard, V. Grijalva, S. Hama, D. M. Shih, M. Navab, A. M. Fogelman, A. J. Lusis, S. Young e S. Reddy, «Paraoxonase-2 deficiency aggravates atherosclerosis in mice despite lower apolipoprotein-B-containing lipoproteins: anti-atherogenic role for paraoxonase-2,» *LIPIDS AND LIPOPROTEINS*, vol. 281, n. 40, pp. 29491-29500, 2006.
- [77] F. Leblond, N. G. Seidah, L. Précourt, E. Delvin, M. Dominguez e E. Levy, «Regulation of the proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 in intestinal epithelial cells,» *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, vol. 296, n. 4, pp. 805-815, 2009.
- [78] M. Rosenblat, D. Draganov, C. E. Watson, C. L. Bisgaier, B. N. L. Du e M. Aviram, «Mouse macrophage paraoxonase 2 activity is increased whereas cellular paraoxonase 3 activity is decreased under oxidative stress,» *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 23, n. 3, pp. 468-474, 2003.
- [79] G. Giordano, L. Tait, C. E. Furlong, T. B. Cole, T. J. Kavanagh e L. G. Costa, «Gender differences in brain susceptibility to oxidative stress are mediated by levels of paraoxonase-2 expression,» *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 58, pp. 98-108, 2013.

- [80] S. Altenhofer, I. Witte, J. F. Teiber, P. Wilgenbus, A. Pautz, H. Li, A. Daiber, H. Witan, A. M. Clement, U. Förstermann e S. Horke, «One Enzyme, Two Functions: PON2 PREVENTS MITOCHONDRIAL SUPEROXIDE FORMATION AND APOPTOSIS,» *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, vol. 285, n. 32, p. 24398–24403, 2010.
- [81] E. M. Schweikert, A. Devarajan, I. Witte, P. Wilgenbus, J. Amort, U. Förstermann, A. Shabazian, V. Grijalva, D. M. Shih, R. F. Eisner, J. F. Teiber, S. T. Reddy e S. Horke, «PON3 is upregulated in cancer tissues and protects against mitochondrial superoxide-mediated cell death,» *Cell Death Differ*, vol. 19, n. 9, pp. 1549-1560, 2012.
- [82] I. Witte, U. Foerstermann, A. Devarajan, S. T. Reddy e S. Horke, «Protectors or Traitors: The Roles of PON2 and PON3 in Atherosclerosis and Cancer,» *Journal of Lipids*, vol. 2012, 2012.
- [83] S. Cory, D. S. Huang e J. M. Adams, «The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis,» *Oncogene volume*, vol. 22, n. 53, pp. 8590-8607, 2003.
- [84] M. D. Tibbetts, L. Zheng e M. J. Lenardo, «The death effector domain protein family: regulators of cellular homeostasis,» *Nature Immunology*, vol. 4, n. 5, pp. 404-409, 2003.
- [85] S. Elmore, «Apoptosis: a review of programmed cell death,» *Toxicol Pathology*, vol. 35, n. 4, pp. 495-516, 2007.
- [86] I. Witte, S. Altenhöfer, P. Wilgenbus, J. Amort, A. M. Clement, A. Pautz, H. Li, U. Förstermann e S. Horke, «Beyond reduction of atherosclerosis: PON2 provides apoptosis resistance and stabilizes tumor cells,» *Cell Death Disease*, vol. 2, n. e112, 2011.
- [87] J. Ma, X. Peng, X. Zhang, F. Chen e M. Wang, «Dual effects of phloretin and phloridzin on the glycation induced by methylglyoxal in model systems,» *Chemical research in toxicology*, vol. 24, n. 8, pp. 1304-1311, 2011.
- [88] H. Kang, M. I. Chen, C. S. Wilson, E. J. Bedrick, R. C. Harvey, S. R. Atlas, M. Devidas, C. G. Mullighan, X. Wang, M. Murphy, K. Ar, W. Wharton, M. J. Borowitz, P. Bowman, D. Bhojwani, W. L. Carroll e M. Bruce, «Gene expression classifiers for relapse-free survival and minimal residual disease improve risk classification and outcome prediction in pediatric B-precursor acute lymphoblastic leukemia,» *Blood*, vol. 115, n. 7, pp. 1394-1405, 2010.



- [89] T. Bacchetti, D. Sartini, V. Pozzi, T. Cacciamani, G. Ferretti e M. Emanuelli, «Exploring the role of Paraoxonase-2 in bladder cancer: analyses performed on tissue samples, urines and cell cultures,» *Oncotarget*, vol. 8, n. 17, pp. 28785-28795, 2017.
- [90] O. Frank, B. Brors, A. Fabarius, L. Li, M. Haak, S. Merk, U. Schwindel, C. Zheng, M. C. Müller, N. Gretz, R. Hehlmann, A. Hochhaus e W. Seifarth, «Gene expression signature of primary imatinib-resistant chronic myeloid leukemia patients,» *Leukemia*, vol. 20, n. 8, pp. 1400-1407, 2006.
- [91] A. Nagarajan, S. K. Dogra, L. Sun, N. Gandotra, T. Ho, G. Cai, G. Cline, P. Kumar, R. A. Cowles e N. Wajapeyee, «Paraoxonase 2 Facilitates Pancreatic Cancer Growth and Metastasis by Stimulating GLUT1-Mediated Glucose Transport,» *Mol Cell*, vol. 67, n. 4, pp. 685-701, 2017.
- [92] D. M. Shih, L. Gu, S. Hama, Y. R. Xia, M. Navab, A. M. Fogelman e A. J. Lusis, «Genetic-Dietary Regulation of Serum Paraoxonase Expression and Its Role in Atherogenesis in a mouse model,» *Journal of Clinical Investigation*, vol. 97, n. 7, pp. 1630-1639, 1996.
- [93] T. Hayek, M. Kaplan, R. Kerry e M. Aviram, «Macrophage NADPH oxidase activation, impaired cholesterol fluxes, and increased cholesterol biosynthesis in diabetic mice: a stimulatory role for D-glucose,» *Atherosclerosis*, vol. 195, pp. 277-286, 2007.
- [94] O. Hussein, J. Zidan, K. A. Jabal, I. Shams, S. Szvalb, M. Grozovski, I. Bersudsky, R. Karry e M. Aviram, «Paraoxonase Activity and Expression Is Modulated by Therapeutics in Experimental Rat Nonalcoholic Fatty Liver Disease,» *International Journal of Hepatology*, 2012.
- [95] M. Rosenblat, T. Hayek, K. Hussein e M. Aviram, «Decreased Macrophage Paraoxonase 2 Expression in Patients With Hypercholesterolemia Is the Result of Their Increased Cellular Cholesterol Content: Effect of Atorvastatin Therapy,» *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 24, n. 1, pp. 175-180, 2004.
- [96] M. Shiner, B. Fuhrman e M. Aviram, «Macrophage paraoxonase 2 (PON2) expression is up-regulated by pomegranate juice phenolic anti-oxidants via PPAR $\gamma$  and AP-1 pathway activation,» *Atherosclerosis*, vol. 195, pp. 313-321, 2007.

- [97] M. Shiner, B. Fuhrman e M. Aviram, «A biphasic U-shape effect of cellular oxidative stress on the macrophage anti-oxidant paraoxonase 2 (PON2) enzymatic activity,» *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 349, n. 3, pp. 1094-1096, 2006.
- [98] C. B. S. Xiangnan Zhang 1, Y. Lou, S. Wolfram, P. Huebbe e G. Rimbach, «Ochratoxin A induces apoptosis in neuronal cells,» *Genes Nutr*, vol. 4, n. 1, pp. 41-48, 2009.
- [99] O. Rom e M. Aviram, «Paraoxonase2 (PON2) and oxidative stress involvement in pomegranate juice protection against cigarette smoke-induced macrophage cholesterol accumulation,» *Chem Biol Interact*, vol. 259, n. pt B, pp. 394-400, 2016.
- [100] E. S. Fernandes, M. O. Machado, A. Minuzzi, M. Becker, F. D. Andrade, M. Maraschin e E. L. Silva, «Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) enhances the gene modulation and activity of paraoxonase-2: In vitro and in vivo studies,» *Nutrition*, vol. 28, n. 11-12, pp. 1157-1164, 2012.
- [101] A. Gugliucci, «Antioxidant Effects of *Ilex Paraguariensis*: Induction of Decreased Oxidability of Human LDLin Vivo,» *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 224, n. 2, pp. 338-344, 1996.
- [102] E. C. DeMorais, A. Stefanuto, G. A. Klein, B. C. B. Boaventura, F. deAndrade, E. Wazlawik, F. DiPietro, M. Maraschin e E. L. DaSilva, «Consumption of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dyslipidemic subjects and provides an additional LDL-cholesterol reduction in individuals on statin therapy,» *J Agric Food Chem*, vol. 57, pp. 8316-8324, 2009.
- [103] I. Yehuda, Z. Madar, A. S. Sapir e S. Tamir, «Glabridin, a phytoestrogen from licorice root, up-regulates manganese superoxide dismutase, catalase and paraoxonase 2 under glucose stress,» *Phytother Res*, vol. 25, n. 5, pp. 659-667, 2011.
- [104] I. Yehuda, Z. Madar, A. L. Frenkel, A. S. Sapir, F. Magzal, G. Markman e S. Tamir, «Glabridin, an isoflavan from licorice root, upregulates paraoxonase 2 expression under hyperglycemia and protects it from oxidation,» *Mol Nutr Food Res*, vol. 60, n. 2, pp. 287-299, 2016.
- [105] R. A. Hegele, P. W. Connelly, S. W. Scherer, A. J. G. Hanley, S. B. Harris, L. C. Tsui e B. Zinman, «Paraoxonase-2 gene (PON2) G148 variant associated with elevated fasting plasma

glucose in noninsulin-dependent diabetes mellitus,» *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, vol. 82, n. 10, pp. 3373-3377, 1997.

- [106] F. Thameem, X. He, V. S. Voruganti, S. D. Nath, P. Fanti, J. Blangero, J. W. Maccluer, A. G. Comuzzie, N. H. Arar e H. E. Abboud, «Evaluation of polymorphisms in paraoxonase 2 (PON2) gene and their association with cardiovascular-renal disease risk in Mexican Americans,» *Kidney & blood pressure research*, vol. 32, n. 3, pp. 200-204, 2009.
- [107] C. Busch, D. Ramdath, S. Ramsewak e R. Hegele, «Association of PON2 variation with birth weight in Trinidadian neonates of South Asian ancestry,» *Pharmacogenetics*, vol. 9, n. 3, pp. 351-356, 199.
- [108] H. Y. Liang, B. Y. Wu, D. Chen, F. Yang, H. Y. Hu, L. Chen e X. P. Xu, «[Association of PON2 gene polymorphisms in neonates with preterm],» *Yi chuan = Hereditas*, vol. 24, n. 5, pp. 515-518, 2002.
- [109] D. K. Sanghera, C. E. Aston, N. Saha e M. I. Kamboh, «DNA polymorphisms in two paraoxonase genes (PON1 and PON2) are associated with the risk of coronary heart disease,» *American journal of human genetics*, vol. 62, n. 1, pp. 36-44, 1998.
- [110] Q. Qin, Y. Li, F. Zhao, H. Wang, Y. Li, R. Cui e B. Zhao, «[Association of paraoxonase polymorphisms and serum homocysteine thiolactone complex with coronary heart disease],» *Zhonghua xin xue guan bing za zhi*, vol. 34, n. 9, pp. 803-807, 2006.
- [111] A. Jalilian, E. Javadi, M. Akrami e H. Fakhrzadeh, «Association of cys 311 ser polymorphism of paraoxonase-2 gene with the risk of coronary artery disease,» *Archives of Iranian medicine*, vol. 11, n. 5, pp. 544-549, 2008.
- [112] S. Y. Su, J. H. Chen, J. F. Huang, X. Wang, J. Zhao, Y. Shen, B. Qiang e D. Gu, «Paraoxonase gene cluster variations associated with coronary heart disease in Chinese Han women,» *Chinese medical journal*, vol. 118, n. 14, pp. 1167-1174, 2005.
- [113] F. Marchegiani, L. Spazzafumo, M. Provinciali, M. Cardelli, F. Olivieri, C. Franceschi, F. Lattanzio e R. Antonicelli, «Paraoxonase2 C311S polymorphism and low levels of HDL contribute to a higher mortality risk after acute myocardial infarction in elderly patients,» *Molecular genetics and metabolism*, vol. 98, n. 3, pp. 314-318, 2009.

- [114] W. N. Reichelt, D. Waldschitz, C. Herwig e L. Neutsch, «Bioprocess monitoring: minimizing sample matrix effects for total protein quantification with bicinchoninic acid assay,» *J Ind Microbiol Biotechnol*, vol. 43, pp. 1271-1280, 2016.
- [115] H. B. Kim e B. S. Yoo, «Propolis Inhibits UVA-Induced Apoptosis of Human Keratinocyte HaCaT Cells by Scavenging ROS,» *Toxicol Res*, vol. 32, n. 4, pp. 345-351, 2016.
- [116] G. T. Wondrak, M. J. Roberts, D. C. Laurean, M. K. Jacobson e E. L. Jacobson, «Proteins of the extracellular matrix are sensitizers of photo-oxidative stress in human skin cells,» *J Invest Dermatol*, vol. 121, n. 3, pp. 578-586, 2003.
- [117] B. Fuhrman, A. Gantman, J. Khateeb, N. Volkova, S. Horke, J. Kiyam, I. Dumler e M. Aviram, «Urokinase activates macrophage PON2 gene transcription via the PI3K/ROS/MEK/SREBP-2 signalling cascade mediated by the PDGFR-beta,» *Cardiovasc Res*, vol. 84, n. 1, pp. 145-154, 2009.
- [118] Z. J. OSD, «The polymorphism of paraoxonase and its effects in physiological and pathological processes,» *Advances in clinical and experimental medicine : official organ Wroclaw Medical University*, vol. 15, pp. 1073-1078, 2006.
- [119] M. Schuler e D. R. Green, «Mechanisms of p53-dependent apoptosis,» *Biochemical Society Transactions*, vol. 29, n. 6, pp. 684-688, 2001.
- [120] Sakurra. [Online]. Available: <https://fr.depositphotos.com/188016496/stock-illustration-uvb-uva-explained-filtering-rays.html>.
- [121] «Wikipedia,» [Online]. Available: <https://it.wikipedia.org/wiki/Melanocita>.
- [122] «X 115,» [Online]. Available: <https://magazine.x115.it/tesi-antirughe/derma/>.
- [123] A. Kontush, S. C. Chapman e M. J. Chapman, «Small, Dense HDL Particles Exert Potent Protection of Atherogenic LDL Against Oxidative Stress,» *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 23, n. 10, pp. 1881-1888, 2003.
- [124] B. Mackness, R. B. Debon, G. Aragonas, J. Joven, J. Camps e M. Mackness, «Human tissue distribution of paraoxonases 1 and 2 mRNA,» *IUBMB Life*, vol. 62, n. 6, pp. 480-482, 2010.

- [125] J. Choi, H. D. Rees, S. T. Weintraub, A. I. Levey, L. Chin e L. Li, «Oxidative modifications and aggregation of Cu,Zn-superoxide dismutase associated with Alzheimer and Parkinson diseases,» *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, n. 12, pp. 11648-11655, 2005.
- [126] C. B. Saadatmandi, R. T. Pospissil, A. C. Graeser, R. Canali, I. Boomgaarden, F. Doering, S. Wolffram, S. Egert, M. J. Mueller e G. Rimbach, «Effect of quercetin on paraoxonase 2 levels in RAW264.7 macrophages and in human monocytes--role of quercetin metabolism,» *Int J Mol Sci*, vol. 10, n. 9, pp. 4168-4177, 2009.
- [127] D. Sulaiman, J. Li, A. Devarajan, C. M. Cunningham, M. Li, G. A. Fishbein, A. M. Fogelman, M. Eghbali e S. T. Reddy, «Paraoxonase 2 protects against acute myocardial ischemia-reperfusion injury by modulating mitochondrial function and oxidative stress via the PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  RISK pathway,» *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 129, pp. 154-164, 2019.
- [128] D. M. Shih, Y. Meng, T. Sallam, L. Vergnes, M. L. Shu, K. Reue, P. Tontonoz, A. M. Fogelman, A. J. Lusis e S. T. Reddy, «PON2 Deficiency Leads to Increased Susceptibility to Diet-Induced Obesity,» *Antioxidants*, vol. 8, n. 19, 2019.
- [129] D. J. Ecobichon, «The Basic Science of Poisons. In cassarett and Doull's Toxicology:Pesticides;New York,» *Pergamon Press*, pp. 580-592, 2001.
- [130] D. I. Draganov, P. L. Stetson, C. E. Watson, S. S. Billecke e B. N. L. Du, «Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation,» *The Journal of biological chemistry*, vol. 275, n. 43, pp. 33435-33442, 2000.
- [131] E. G. Moreira, K. M. Bolla, D. G. Correia, J. F. Soares, C. Rigobello e M. Maes, «Why Should Psychiatrists and Neuroscientists Worry about Paraoxonase 1?,» *Current Neuropharmacology*, vol. 17, n. 11, pp. 1004-1020, 2019.
- [132] G. Gawade e R. R. Melinkeri, «Oxidative Stress and Paraoxonase (PON - 1) Status in Diabetic Nephropathy,» *International Journal of Health Sciences and Research*, vol. 5, n. 12, 2015.
- [133] H. Mochizuki, S. WScherer, T. Xi, D. C. Nickle, M. Majer, J. J. Huizenga, L. C. Tsui e M. Prochazka, «Human PON2 gene at 7q21.3: cloning, multiple mRNA forms, and missense polymorphisms in the coding sequence,» *Gene*, vol. 213, n. 1-2, pp. 149-157, 1998.

- [134] J. M. Garrick, K. Dao, R. D. Laat, J. Elsworth, T. B. Cole, J. Marsillach, C. E. Furlong e L. G. Costa, «DEVELOPMENTAL EXPRESSION OF PARAOXONASE 2,» *Chem Biol Interact*, vol. 259, n. Pt.B, 2016.
- [135] J. P. Kaján e H. Jakubowski, «Paraoxonase 1 and homocysteine metabolism,» *Amino Acids*, vol. 43, n. 4, pp. 1405-1417, 2012.
- [136] J. K. Lee, J. H. Kim, K. T. Nam e S. H. Lee, «Molecular events associated with apoptosis and proliferation induced by ultraviolet-B radiation in the skin of hairless mice,» *Journal of Dermatologica Science*, vol. 32, n. 3, pp. 171-179, 2003.
- [137] K. Priyanka, S. Singh e K. Gill, «Paraoxonase 3: Structure and Its Role in Pathophysiology of Coronary Artery Disease,» *Biomolecules*, vol. 9, n. 817, 2019.
- [138] L. G. Wood, D. A. Fitzgerald, P. G. Gibson, D. M. Cooper, C. E. Collins e M. L. Garg, «Oxidative stress in cystic fibrosis: dietary and metabolic factors,» *Journal of the American College of Nutrition*, vol. 20, n. 2, pp. 157-165, 2001.
- [139] L. Dikbas, I. H. T. R. Dur, O. E. Yapça e N. Dikbas, «Low transcriptional activity of PON2 in recurrent abortion: A novel therapeutic agent?,» *Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction*, vol. 47, n. 8, pp. 379-383, 2018.
- [140] L. G. Costa, R. Laat, K. Dao, C. Pellacani, T. B. Cole e C. E. Furlong, «Paraoxonase-2 (PON2) in brain and its potential role in neuroprotection,» *Neurotoxicology*, vol. 43, pp. 3-9, 2014 July.
- [141] M. N. Rao, P. Marmillot, M. Gong, D. A. Palmer, L. B. Seeff, D. B. Strader e M. Lakshman, «Light, but not heavy alcohol drinking, stimulates paraoxonase by upregulating liver mRNA in rats and humans,» *Metabolism clinical and experimental*, vol. 52, n. 10, pp. 1287-1294, 2003.
- [142] M. Landriscina, F. Maddalena, G. Laudiero e F. Esposito, «Adaptation to Oxidative Stress, Chemoresistance, and Cell Survival,» *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING*, vol. 11, n. 11, pp. 2701-2716, 2009.
- [143] M. Aviram, N. Volkova, R. Coleman, M. Dreher, M. K. Reddy, D. Ferreira e M. Rosenblat, «Pomegranate phenolics from the peels, arils, and flowers are antiatherogenic: studies in vivo

in atherosclerotic apolipoprotein e-deficient (E 0) mice and in vitro in cultured macrophages and lipoproteins,» *J Agric Food Chem*, vol. 56, pp. 1148-1157, 2008.

- [144] M. Feijóo, I. Túnez, A. Ruiz, I. Tasset, E. Muñoz e E. Collantes, «Oxidative stress biomarkers as indicator of chronic inflammatory joint diseases stage,» *Reumatologia Clinica*, vol. 6, n. 2, pp. 91-94, 2010.
- [145] N. P. Ruiz, F. E. M. González, A. E. R. García, Y. Y. Hernández, M. Mackness, J. P. Gallegos, B. S. B. Vivanco, I. H. Ochoa, C. A. G. Arias, L. O. Cervantes e G. C. Salda, «Phenotypes and concentration of PON1 in cardiovascular disease: The role of nutrient intake,» *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, vol. 30, n. 1, pp. 40-48, 2020.
- [146] R. Ravi, N. R. Nagaraj e B. S. Rajesh, «Effect of advanced glycation end product on paraoxonase 2 expression: Its impact on endoplasmic reticulum stress and inflammation in HUVECs,» *Life Sciences*, vol. 246, 2020.
- [147] S. T. Reddy, A. Devarajan, N. Bourquard, D. Shih e A. M. Fogelman, «Is it just paraoxonase 1 or are other members of the paraoxonase gene family implicated in atherosclerosis?,» *Current opinion in lipidology*, vol. 19, n. 4, pp. 405-408, 2008.
- [148] R. Brem, P. Macpherson, M. Guven e P. Karran, «Oxidative stress induced by UVA photactivation of the tryptophan UVB photoproduct 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ) inhibits nucleotide excision repair in human cells,» *Scientific Reports*, vol. 7, n. 4310, 2017.
- [149] S. E. Altin e P. C. Schulze, «p53-upregulated modulator of apoptosis (PUMA): a novel proapoptotic molecule in the failing heart,» *Circulation*, vol. 124, n. 1, pp. 7-8, 2011.
- [150] S. Pillai, C. Oresajo e J. Hayward, «Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactiveoxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation,» *International Journal of Cosmetic*, vol. 27, pp. 17-34, 2005.
- [151] K. Scharffetter, M. Wlaschek, A. Hogg, K. Bolsen, A. Schothorst, G. Goerz, T. Krieg e G. Plewig, «UVA irradiation induces collagenase in human dermal fibroblasts in vitro and in vivo,» *Arch Dermatol Res*, vol. 283, n. 8, pp. 506-511, 1991.

- [152] Y. Liu, D. Zhu, G. Dong, Y. Zeng, P. Jiang e Y. Xiao, «Liver paraoxonase 3 expression and the effect of liraglutide treatment in a rat model of diabetes,» *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, vol. 30, n. 2, pp. 157-163, 2021.
- [153] Y. Shind e L. P. Eric Witt, «Antioxidant defense mechanisms in murine epidermis and dermis and their responses to ultraviolet light,» *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 100, n. 3, pp. 260-265, 1993.
- [154] Y. Shokri, A. Variji, M. Nosrati, A. K. Tarsi, A. Kianmehr, Z. Kashi, A. Bahar, A. Bagheri e A. Mahrooz, «Importance of paraoxonase 1 (PON1) as an antioxidant and antiatherogenic enzyme in the cardiovascular complications of type 2 diabetes: Genotypic and phenotypic evaluation,» *Diabetes Research and clinical practice*, vol. 161, 2020.
- [155] V. E. Kagan, H. A. Bayır, N. A. Belikova, O. Kapralov, Y. Y. Tyurina, V. A. Tyurin, J. Jiang, D. A. Stoyanovsky, P. Wipf, P. M. Kochanek, J. S. Greenberger, B. Pitt, A. A. Shvedova e G. Borisenko, «Cytochrome c/cardiolipin relations in mitochondria: a kiss of death,» *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 46, n. 11, pp. 1439-1453, 2009.
- [156] Z. A. Solak, C. Kabaroglu, G. Cok, Z. Parildar, U. Bayindir, D. Ozmen e O. Bayindir, «Effect of different levels of cigarette smoking on lipid peroxidation, glutathione enzymes and paraoxonase 1 activity in healthy people,» *Clinical and experimental medicine*, vol. 5, n. 3, pp. 99-105, 2005.
- [157] M. Harel, A. Aharoni, L. Gaidukov, B. Brumshtein, O. Khersonsky, R. Meged, H. Dvir, R. B. G. Ravelli, A. McCarthy, L. Toker, I. Silman, J. L. Sussman e D. S. Tawfik, «Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes,» *Nature Structural & Molecular Biology*, vol. 11, n. 5, pp. 412-419, 2004.