



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di laurea magistrale in
BIOLOGIA MOLECOLARE E APPLICATA

**MESSA A PUNTO DI UN MODELLO DI STRESS
GLICO-OSSIDATIVO IN CELLULE CACO-2 PER LA
VALUTAZIONE DELL'EFFETTO PROTETTIVO DI
FITOCOMPOSTI**

**DEVELOPMENT OF A GLYCO-OXIDATIVE STRESS MODEL IN
CACO-2 CELLS FOR EVALUATION OF THE PROTECTIVE
EFFECT OF PHYTOCOMPOUNDS**

Tesi di Laurea di:
Alessia Bruni

Relatore:
Prof.ssa Tiziana Bacchetti

Correlatore:
Prof.ssa Elisabetta Damiani
Dott.ssa Luisa Bellachioma

Sessione Autunnale

Anno Accademico 2021/2022

INDICE

1. SCOPO DELLA TESI	pag.4
2. INTRODUZIONE	pag.7
2.1 Stress glico-ossidativo e malattie intestinali croniche	pag.7
2.1.1 Stress ossidativo	pag.7
2.1.2 Glicazione non enzimatica e glico-ossidazione	pag.10
2.1.3 Ruolo del metilgliosale nei processi glico-ossidativi	pag.16
2.1.4 Stress glico-ossidativo e epigenetica	pag.22
2.1.5 Effetti fisio-patologici della glico-ossidazione a livello intestinale	pag.26
2.2 Sistemi di difesa antiossidanti nel tratto gastrointestinale	pag.32
2.2.1 Sistemi di difesa endogeni	pag.34
2.2.2 Sistemi di difesa esogeni	pag.36
2.3 <i>Crocus Sativus</i>: cenni generali	pag.41
3. MATERIALI E METODI	pag.46
3.1 Modello sperimentale: linea cellulare Caco-2	pag.46
3.1.1 Trattamento cellule con MGO	pag.48
3.1.2 Trattamento cellule con polifenoli	pag.49
3.2 Valutazione del danno glico-ossidativo: analisi della citometria a flusso	pag.56
3.2.1 Analisi dei ROS citoplasmatici	pag.57
3.2.2 Analisi dei ROS mitocondriali	pag.61
3.3 Valutazione degli effetti della glico-ossidazione sull'espressione genica	pag.62
3.3.1 quantificazione proteica mediante metodo BCA	pag.63
3.3.2 Real time PCR	pag.65

3.3.3	Analisi dell'espressione proteica mediante western blot.....	pag.69
4.	RISULTATI E DISCUSSIONE.....	pag.74
4.1	Valutazione dell'effetto citotossico del Metilgliosale.....	pag.74
4.2	Effetto del MGO sui livelli di ROS citosolici.....	pag.76
4.3	Effetto MGO sui livelli di ROS mitocondriali.....	pag.80
4.4	Meccanismi molecolari: stress ossidativo.....	pag.82
4.5	Meccanismi molecolari: apoptosi.....	pag.86
4.6	Meccanismi molecolari: infiammazione.....	pag.90
4.7	Modifiche epigenetiche indotte da MGO.....	pag.92
4.8	Valutazione dell'effetto protettivo dei polifenoli sullo stress glico-ossidativo.....	pag.98
5.	CONCLUSIONI.....	pag.103
6.	BIBLIOGRAFIA	pag.109

1. SCOPO DELLA TESI

La malattia infiammatoria intestinale (IBD) è il disturbo gastrointestinale funzionale più comune con un'incidenza mondiale fino al 10-20% (Shuang Z. et al. 2014) , comprende malattie infiammatorie croniche recidivanti, come il morbo di Crohn e la colite ulcerosa. La sua eziologia non è del tutto chiara ma si ritiene che le interazioni tra vari fattori, inclusi fattori genetici, il sistema immunitario dell'ospite e fattori ambientali, causino l'interruzione dell'omeostasi intestinale, portando a risposte infiammatorie disregolate dell'intestino. La mucosa intestinale, è soggetta ad un elevato stress glicossidativo, proprio per la sua continua esposizione alle specie reattive dell'ossigeno (ROS) e prodotti di glicazione avanzata (AGEs) sia endogene, che esogene. Un eccessivo accumulo di prodotti di glicazione avanzata (AGEs) provoca stress ossidativo ed innesca processi infiammatori sia nel lume che nella mucosa intestinale. Questi processi nel tempo portano ad una alterazione della funzionalità della barriera intestinale e alla compromissione della sua struttura causando un'elevata erosione delle mucose. Questi eventi possono svolgere un ruolo chiave nel promuovere numerose infezioni intestinali e pongono le basi per lo sviluppo di malattie gastrointestinali infiammatorie come il morbo di Crohn e la colite ulcerosa (Hong Zhu et al. 2012).

Lo scopo di questo lavoro di tesi è stato quello di mettere appunto un modello di stress-glicossidativo nelle cellule intestinali per valutare l'effetto protettivo di fitocomposti. A tale scopo è stata scelta la linea cellulare Caco-2 (human colorectal adenocarcinoma cells) perché considerata un valido modello di cellule intestinali; esse, infatti, subiscono un processo di differenziazione spontanea che porta alla formazione di un monostrato cellulare con caratteristiche morfologiche e funzionali simili agli enterociti maturi umani. Al fine di indurre stress glico-ossidativo è stato utilizzato il metilgliossale (MGO), un metabolita prodotto nella fase intermedia della reazione di Maillard, dal metabolismo di alcuni batteri intestinali oppure può derivare da processi di lavorazione e stoccaggio di alimenti particolarmente ricchi di zuccheri. Il metilgliossale e altre specie reattive dicarboniliche causano modificazioni irreversibili alle macromolecole biologiche che conducono alla formazione e all'accumulo di advanced glycation end-products (AGE).

Lo stress glico-ossidativo indotto da MGO sulle cellule Caco-2 è stato investigato mediante lo studio della vitalità e la formazione di ROS intracellulari e mitocondriali mediante citofluorimetria. Inoltre, sono stati indagati i meccanismi molecolari alla base del danno glico-ossidativo indotto da MGO.

In particolare, mediante Real time PCR e western blot è stato studiato l'effetto del MGO sull'espressione genica e il possibile coinvolgimento di meccanismi epigenetici.

Infine, allo scopo di investigare se il modello cellulare possa rappresentare un punto di partenza per studi finalizzati a capire gli effetti di molecole di natura antiossidante sul danno glico-ossidativo su cellule intestinali; le cellule trattate con MGO sono state incubate con un estratto ricco polifenoli ottenuto dai tepali di *Crocus sativus* .

2. INTRODUZIONE

2.1 Stress glico-ossidativo e malattie intestinali croniche

2.1.1 Stress ossidativo

Con il termine stress ossidativo si intende uno squilibrio tra ossidanti e antiossidanti a favore degli ossidanti, che porta a un'interruzione della segnalazione e del controllo redox e/o danno molecolare (Helmut S. 2015).

L'alterazione dei processi biochimici può portare alla produzione di specie reattive e limitare la capacità dei macchinismi antiossidanti endogeni che all'interno delle cellule, si occupano di prevenire un aumento incontrollato delle specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto (ROS/RNS).

I ROS sono piccole molecole derivate dall'ossigeno che includono i radicali dell'ossigeno come superossido ($O_2 \cdot^-$), idrossile ($\cdot OH$), perossile ($RO^2 \cdot$), alcossile ($RO\cdot$) e alcuni non radicali che sono agenti ossidanti o sono facilmente convertibili in radicali, come acido ipocloroso ($HOCl$), ozono (O_3), ossigeno singoletto ($^1 O_2$) e perossido di idrogeno ($H_2 O_2$). Possono essere prodotti all'interno delle cellule sia da fonti endogene che esogene. I ROS endogeni vengono prodotti come sottoprodotto negli organelli subcellulari come i mitocondri, i perossisomi e citocromo P-450.

Tra le fonti esogene ritroviamo inquinanti, tabacco, fumo, droghe, xenobiotici e radiazioni (Bowen Y. et al. 2019).

Sebbene una concentrazione moderata di ROS possa agire come secondo messaggero per la regolazione fisiologica i ROS prodotti in eccesso possono danneggiare i sistemi biologici dando il via a reazioni auto catalitiche. Infatti, le molecole con le quali reagiscono, sono esse stesse convertite in radicali liberi che a loro volta sono in grado di propagare il danno (Rahman K. 2007).

Inoltre, possono sopraffare la capacità antiossidante della cellula e innescare la morte cellulare (Trachootham D. et al. 2009).

Il radicale libero più abbondante nei tessuti umani è l'anione superossido ($O_2^{\cdot-}$), generato dall'aggiunta di un elettrone all'ossigeno molecolare (Miller D. et al. 1990). La sua fonte principale in una cellula è il complesso I e III della catena di trasporto degli elettroni mitocondriali, che converte l'1-3% dell'ossigeno totale nell'anione superossido (Muller D. et al. 2004).

In condizioni di stress, le concentrazioni di $O_2^{\cdot-}$ aumentano portando a un'eccessiva produzione di radicali idrossilici deleteri (OH^{\cdot}) attraverso la reazione di Haber-Weiss. Nel tratto gastrointestinale, OH^{\cdot} inattiva un enzima mitocondriale cruciale, la piruvato deidrogenasi, depolimerizza la mucina

gastrointestinale e infligge danni all'RNA e al DNA mitocondriale (Tabatabaie T. et al. 1996 ; Takeuchi T. et al. 1996 ; Halliwell B. 1999).

L'anione superossido è una forma di ROS altamente reattiva, altamente instabile e di breve durata che lo fa reagire molto rapidamente e lo rende impermeabile alla membrana; pertanto, agisce in prossimità del luogo di origine provocando l'ossidazione delle biomolecole circostanti. L' H_2O_2 può diffondersi liberamente attraverso le membrane cellulari e ossidare i composti che si trovano più lontano, ad esempio i lipidi di membrana dei patogeni. È interessante notare che il livello basale di ROS negli enterociti differisce, con una minore concentrazione di ROS nell'intestino tenue e maggiore nel colon. Le differenze nella generazione di ROS possono influenzare i livelli di proteine ossidate, lipidi e danni al DNA, contribuendo così alla maggiore suscettibilità del colon alle malattie gastrointestinali in questi due siti intestinali. (Sanders L. et al. 2004).

È di fondamentale importanza mantenere l'equilibrio tra la generazione e l'eliminazione di ROS per il mantenimento delle funzioni fisiologiche e per la riduzione dell'incidenza delle malattie.

2.1.2 Glicazione non-enzimatica e glico-ossidazione

L'esposizione delle proteine del nostro organismo a zuccheri riducenti, induce una "aggregazione" chimica chiamata glicazione non enzimatica o reazione di Maillard. Il processo di glicazione non enzimatica ha origine dalla reazione tra la forma aperta aldeidica di uno zucchero (glucosio, fruttosio, ribosio) ed un aminoacido (di solito lisina, idrossilisina o valina) di una proteina o un lipide. Poiché la reazione non richiede la presenza di enzimi, la velocità di questa reazione dipende da fattori ambientali, dalla quantità di glucosio nel sangue, dalla quantità di proteine, dalla permeabilità delle cellule al glucosio, dai gruppi amminici liberi, in particolare dalla basicità del gruppo amminico, dalla sua accessibilità sterica e dal pH. Il processo di glicazione non enzimatica delle proteine procede in tre fasi: si formano dapprima le basi di Schiff, prodotti estremamente instabili e reversibili. In seguito, compaiono gli addotti di Amadori (più stabili) ed infine i prodotti di glicazione avanzata (AGEs), chimicamente stabili e non degradabili enzimaticamente.

In particolare, nella fase iniziale, uno zucchero riducente (come il glucosio, fruttosio, il galattosio, il mannosio o lo xilulosio) reagisce con un gruppo amminico libero, appartenente a molecole diverse come le proteine, gli acidi nucleici e i lipidi, formando un composto instabile: la base di Schiff.

Quest'ultima è un composto con gruppo funzionale contenente un doppio legame carbonio-azoto e con l'azoto a sua volta legato a un gruppo arilico o alchilico (Vlassara H. et al. 1994). Nella fase intermedia, attraverso reazioni di ossidazione e deidratazione, i prodotti di Amadori sono degradati in differenti composti carbonilici che, essendo molto più reattivi dello zucchero di partenza, si comportano da propagatori della reazione, in quanto possono reagire nuovamente con i gruppi amminici liberi delle proteine. Tra questi composti carbonilici reattivi c'è il metilgliosale ($C_3H_4O_2$) (Thornalley P. et al. 1996). Nell'ultima fase, i composti carbonilici reattivi reagiscono con i gruppi amminici liberi e, attraverso reazioni di ossidazione, deidratazione e ciclizzazione, formano composti di colore giallo-bruno, spesso fluorescenti, insolubili ed irreversibili detti composti di glicazione avanzata o AGEs. Tra i primi composti AGEs ad essere identificati ci sono i derivati dell'imidazolo (FFI), l'N-carbossimetil-lisina (CML), N-carbossi-etillisina (CEL) che deriva dalla reazione tra il metilgliosale e la lisina, il dimero gliossal-lisina (GOLD) e il dimero metilgliossal-lisina (MOLD), che si formano per reazione del gliosale e del metilgliosale con i residui di lisina.

Esiste una stretta e complessa relazione tra stress ossidativo e formazione di AGEs, infatti si parla di glico-ossidazione.

Durante il processo di glicazione si ha la produzione delle specie reattive dell'ossigeno ROS: infatti, gli zuccheri riducenti e i prodotti di Amadori possono andare incontro ad autossidazione portando alla formazione di anione superossido, radicali idrossilici, perossido di idrogeno (Nishikawa T. et al. 2000). La glicazione non enzimatica delle proteine e la formazione di AGEs in vivo ne provoca un accumulo in special modo in condizioni di iperglicemia, sia nell'ambiente extracellulare e anche all'interno della cellula. Un aumento di AGEs è associato all'instaurazione di processi infiammatori e pro-ossidanti (Uribarri J. et al. 2005) andando ad interagire con specifici recettori (RAGE), sui macrofagi e sulle cellule endoteliali (figura 1), interferendo nel bilancio ossido riduttivo, innescando la sintesi di radicali liberi e di molecole pro-infiammatorie come il fattore di necrosi tumorale (TNF)- α , interleuchina-1 (IL-1) e il fattore di crescita insulin like-1 (IGF-1) (Piarulli M. et al. 2013).

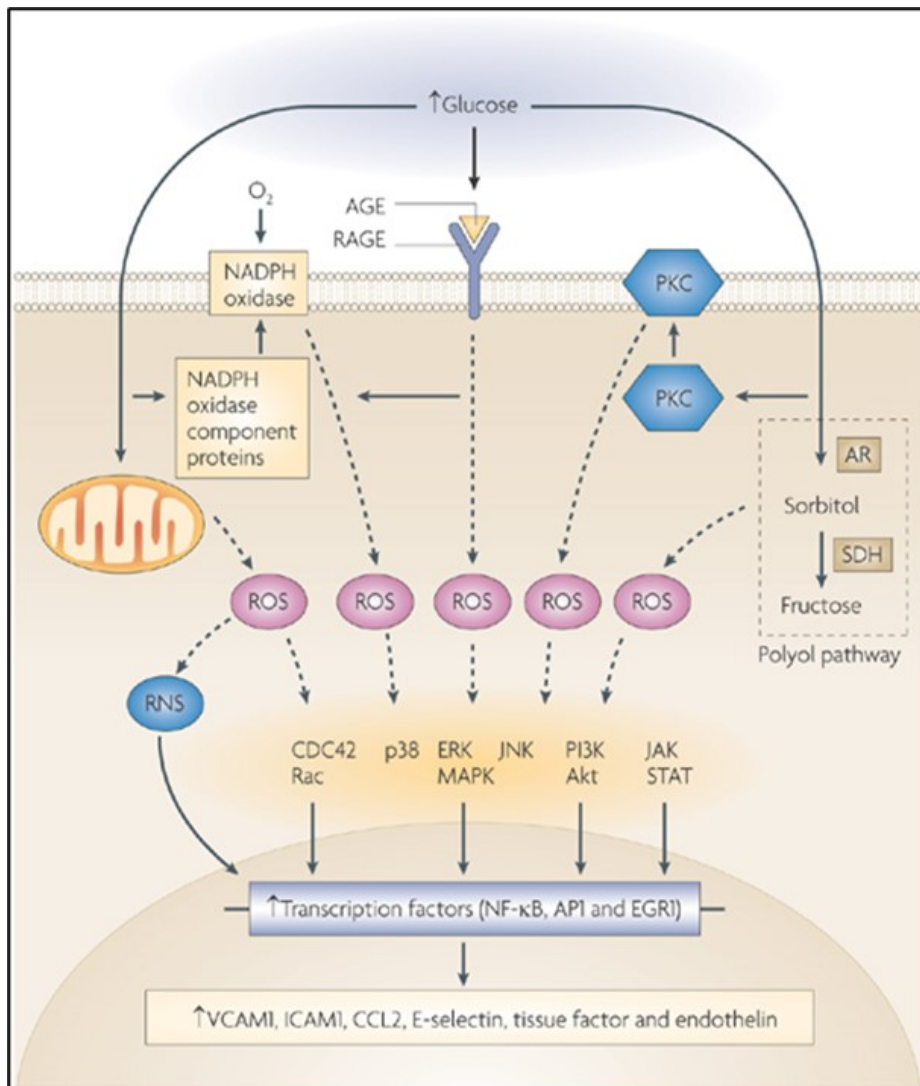


Figura 1 : Rappresentazione delle vie del segnale che vengono influenzate dallo stress ossidativo generato dagli AGE e conseguenti modificazioni ai fattori di trascrizione

La glicazione non enzimatica delle proteine e la formazione di AGEs avvengono in vivo, soprattutto in condizioni di iperglicemia, sia nell'ambiente extracellulare e anche all'interno della cellula. Infatti, è stato visto che un incremento transitorio della glicemia può produrre la formazione di una notevole quantità di aldimmine, una reazione che può essere reversibile con la normalizzazione dei valori glicemici. Tale reazione ha rilevanza clinica in quanto la glicazione non enzimatica causa modifiche strutturali alle principali macromolecole causando l'alterazione delle loro funzioni. La glicossidazione, quindi, rappresenta un comune pathway che porta non solo alle complicazioni del diabete, ma anche di una serie di molteplici patologie cronico- degenerative come obesità, patologie cardiovascolari e invecchiamento come mostrato nella tabella 1 (Ahmed N. 2005; Stitt A. et al. 2005; Forbes J. et al. 2004). Proteine tissutali e plasmatiche come emoglobina, albumina, fibronectina, collagene e lipoproteine subiscono la glicossidazione, presentando alterazioni strutturali che interferiscono con le loro funzioni biologiche. È infatti noto che la glicazione delle lipoproteine plasmatiche rappresenta una modifica pro-aterogena (De caterina R. et al. 2004). La laminina e il collagene sono le principali componenti strutturali della matrice extracellulare e sono sensibili ai danni derivati dalla glicazione in quanto contengono molti residui di lisina, idrossilisina e arginina.

La glicazione causa la perdita della capacità di queste molecole di assemblarsi in polimeri e una ridotta capacità di legarsi agli altri componenti della matrice (Simm A. et al. 2007; Brownlee M. et al. 1988). Possono verificarsi anche alterazioni delle proprietà fisiche come l'aumento della rigidità della fibra e della resistenza enzimatica, modifiche che aumentano lentamente con l'età e vengono accelerate nel diabete mellito a causa di livelli elevati di glucosio (Avery N. et al. 2006).

PATOLOGIA	MECCANISMO DI DANNO	COMPLICAZIONI
Invecchiamento	Stress ossidativo Diminuzione turnover proteico Insulino resistenza	Aterosclerosi Ipertensione Danni renali
Diabete mellito	Iperglicemia	Dislipidemia Cataratta Demenza
Uremia	Stress ossidativo Diminuzione della clearance Insulino resistenza	Osteoporosi

Tabella 1: La glico-ossidazione rappresenta un comune pathway per le complicazioni di alcune patologie croniche

2.1.3 Ruolo del metilgliossale nei processi glico-ossidativi

Le principali specie reattive dicarboniliche presenti nei sistemi fisiologici e responsabili della glicazione sono metilgliossale , gliossale e 3-desossigliucosone. Questi composti causano modificazioni irreversibili alle macromolecole biologiche che conducono alla formazione e all'accumulo di advanced glycation end-products (AGE) quali prodotti terminali della glicazione non-enzimatica nei sistemi fisiologici. Il metilgliossale, chiamato anche piruvaldeide o 2-ossopropanale ($\text{CH}_3\text{-CO-CHO}$ o $\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2$), è un'alfa-ossalaldeide onnipresente nelle cellule viventi ed è contenuto in vari prodotti alimentari (Vistoli G. et al. 2013). Può essere generato sia *in vitro* che *in vivo* e il tasso di formazione è di circa $120\mu\text{mol/d}$, che rappresenta circa lo 0,1% del flusso di glucosio in condizioni normali misurato nei globuli rossi *in vitro*. (Di Tan et al. 2008).

I livelli plasmatici di MGO in soggetti sani vengono analizzati in un range compreso tra 0,1 e $0,5\mu\text{M}$ e sono elevati in condizioni diabetiche (Degen G. et al. 2013). Le fonti endogene coinvolgono diverse vie che possono essere suddivise in reazioni enzimatiche o non enzimatiche.

Come rappresentato nella Figura 2 , nella sintesi endogena troviamo le reazioni catalizzate da metilgliossale sintasi, citocromo P450 2E1, mieloperossidasi e amino ossidasi, e reazioni che includono la decomposizione spontanea del diidrossiacetone-fosfato, la reazione di Maillard e la perossidazione lipidica. Più in dettaglio, la via principale che porta al metilgliossale coinvolge la degradazione enzimatica o non enzimatica degli intermedi trioso fosfato originati dai processi glicolitici. Gli intermedi includono gliceraldeide 3-fosfato (4.4 in Figura 2) e diidrossiacetone-fosfato (4.5 in Figura 2), che sono in equilibrio a causa dell'attività della triosefosfato isomerasi. Pertanto, il diidrossiacetone-fosfato può produrre metilgliossale sia per eliminazione spontanea non enzimatica del gruppo fosfato sia per effetto della metilgliossal-sintasi, un enzima presente nei sistemi procariotici e dei mammiferi e inibito dagli ioni fosfato inorganici.

Anche i lipidi possono partecipare alla generazione del metilgliossale attraverso il metabolismo dell'acetone (Vistoli G. et al 2013).

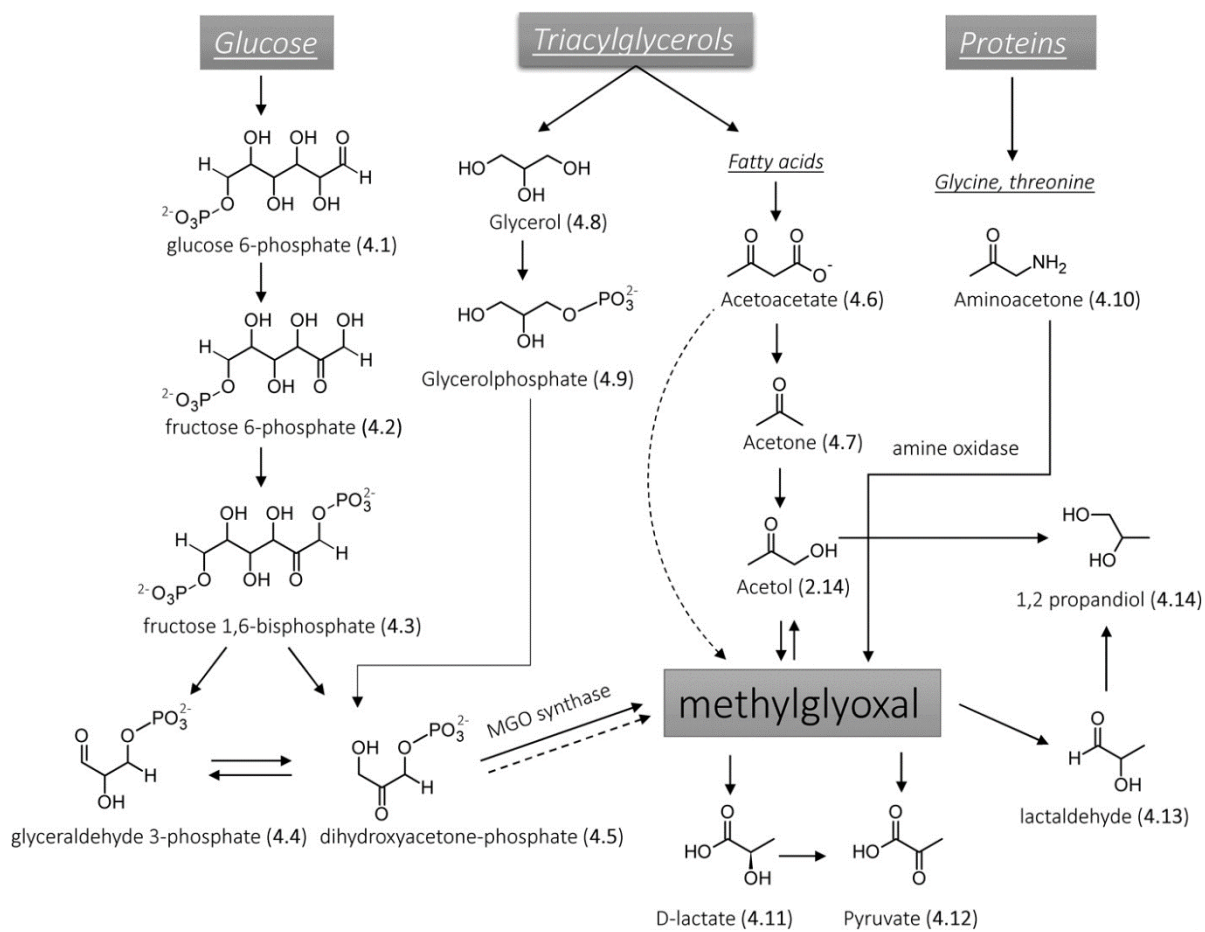


Figura 2. Percorsi schematici per la formazione e il catabolismo di MGO (le linee tratteggiate indicano la formazione di MGO non enzimatica)

La formazione di MGO è contrastata dal sistema della gliossalasi che comprende due enzimi consecutivi: la gliossalasi I (GlxI) e la gliossalasi II (GlxII) (Figura 3). Il D-lattato è il prodotto finale e il glutatione (GSH) è usato come cofattore. La gliossalasi I (EC 4.4.1.5), una lattoglutatione liasi, catalizza l'isomerizzazione dell'emittioacetale formato non enzimaticamente da MGO e ridotto GSH per formare SD-lattoilglutatione. La gliossalasi II (EC 3.1.2.6), idrossiacilglutatione idrolasi, catalizza l'idrolisi dell'SD-lattoilglutatione ad acido D-lattico e ripristina la molecola di GSH esaurita nella prima reazione (Cianfruglia L. et al. 2020).

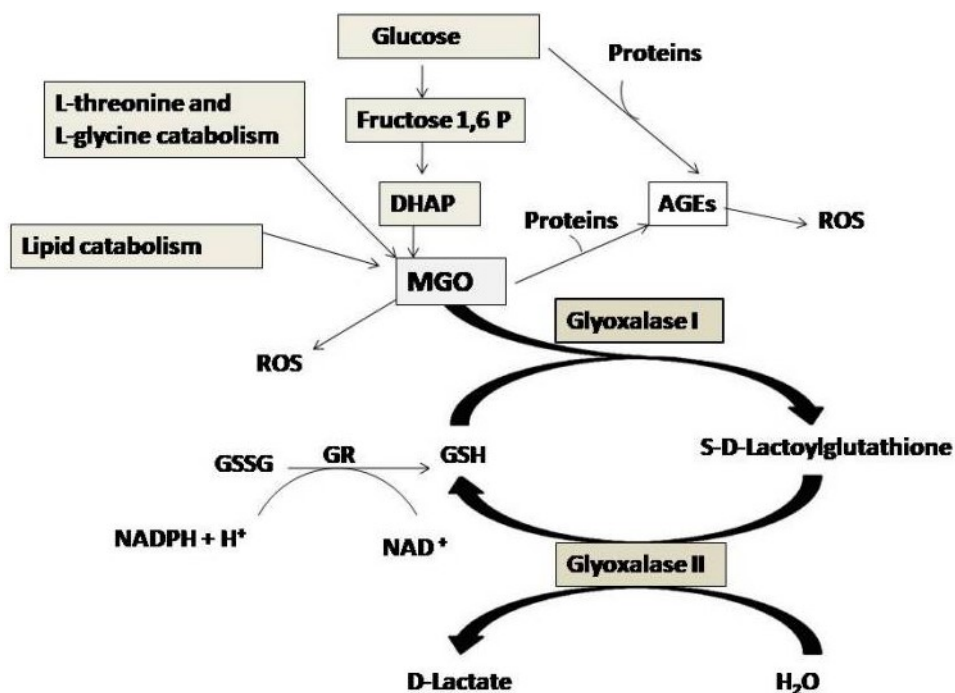


Figura 3: Formazione di MGO da intermedi del metabolismo del glucosio, delle proteine e dei grassi e sua degradazione da parte del sistema della gliossalasi

Essendo legato al metabolismo cellulare, il tasso di formazione di MGO dipende dall'organismo, dal tessuto, dal metabolismo cellulare e dalle condizioni fisiologiche (De Bari L. et al. 2021). La sua formazione può avvenire anche per via esogena.

È stato rilevato inizialmente nel caffè con quantità comprese tra 1,6 e 7,0 mg/L e negli alimenti fermentati come vino (0,1–2,9 mg/L), yogurt (0,6–1,3 mg/kg) e salsa di soia (8,7 mg/kg). Ad oggi lo ritroviamo in una varietà di alimenti, principalmente in prodotti trattati termicamente e ricchi di zucchero come aceto balsamico, biscotti, marmellate e a livelli molto bassi nei prodotti lattiero-caseari (<1,6 mg/ L) (Degen J. et al. 2013).

Gli zuccheri possono generare metilgliosale attraverso la reazione retroaldolica o la frammentazione auto-ossidativa e, sebbene questi processi siano fortemente favoriti dalle condizioni alcaline, possono verificarsi anche durante la caramellizzazione per riscaldamento di mono-, oligo- e polisaccaridi. Oltre ai processi di riscaldamento, anche lo stoccaggio prolungato può degradare gli zuccheri per generare metilgliosale attraverso un processo particolarmente favorito negli alimenti ad alto contenuto di carboidrati semplici. Durante la produzione industriale e lo stoccaggio, anche i lipidi possono frammentare inducendone l'accumulo.

Infine, molti microrganismi producono metilgliossale a partire dalla glicolisi anaerobica dei carboidrati nell'intestino crasso e quindi la fermentazione può causare un aumento di questo prodotto dicarbonilico nelle bevande alcoliche e negli alimenti fermentati.

L' MGO può essere sintetizzato anche a livello intestinale dal metabolismo dei batteri intestinali come *Proteus spp.*, *Aeromonas*, *E. coli* e *Salmonella* sono in grado di produrre MGO grazie all'enzima metilgliossilasi sintasi a partire dal diidroacetonefosfato derivante dalla glicolisi. Infatti, la sintesi batterica rappresenta una delle maggiori cause della produzione di questi composti a livello intestinale (Baskaran S. et al. 1989).

Per quanto riguarda le fonti ambientali, i processi di combustione, come ad esempio il fumo di sigaretta, possono generare metilgliossale.

2.1.4 Stress glico-ossidativo e epigenetica

Con il termine Epigenetica si intende lo studio dei cambiamenti nella funzione genica che sono mitoticamente e/o meioticamente ereditabili e che non comportano un cambiamento nella sequenza del DNA (Dupont C. et al 2009). Ciò che viene ereditato è una sorta di "impronta" molecolare sul genotipo che determina il grado di attivazione dei geni, la cui sequenza, però, rimane identica. Questa impronta consta di modificazioni covalenti della cromatina, sia a livello del DNA che delle proteine, ed è pertanto duratura, ma può essere reversibile.

La struttura globale della cromatina è organizzata all'interno della cellula in due stati: l'eucromatina rappresenta quella forma in cui il DNA è poco condensato e permette la trascrizione del codice genetico mentre nella forma di eterocromatina il DNA si trova in uno stato super avvolto da non permettere la lettura della sequenza da parte dell'apparato trascrizionale.

E' stato visto che lo stress ossidativo può stimolare la perdita globale di eterocromatina, agire sulla metilazione e avere effetti diretti sugli istoni influenzando così l'espressione genica, la stabilità e la replicazione del genoma (Halicka H. et al. 2008).

La metilazione del DNA è una delle modificazioni epigenetiche più comuni che consiste nell'aggiunta di un gruppo metile ad una citosina presente nei siti CpG, ovvero una regione in cui un nucleotide della citosina si trova accanto a un nucleotide della guanina che è legato da un fosfato. Questi siti sono metilati da uno dei tre enzimi chiamati DNA metiltransferasi (DNMT) e l'inserimento di gruppi metilici cambia l'aspetto e la struttura del DNA, modificando le interazioni di un gene con l'apparato responsabile della trascrizione all'interno del nucleo di una cellula (Egger G. et al. 2004).

I DNMT utilizzano la S-adenosilmetionina (SAM), sintetizzata dalla metionina adenosiltransferasi (MAT), per trasferire un gruppo metilico alla citosina, per questo la metilazione del DNA viene bloccata in seguito alla diminuzione di SAM. L'esaurimento di quest'ultima può essere innescato dallo stress ossidativo attraverso diversi meccanismi uno dei quali è l'ossidazione del MAT che ne determina l'inattivazione e quindi la ridotta sintesi di SAM dalla metionina (Jarrett J. et al. 1998).

Un meccanismo per l'ipermetilazione del DNA in caso di stress ossidativo è l'inibizione delle proteine TET che svolgono ruoli centrali nella demetilazione del DNA. Queste possono essere inattivate dall'ossidazione del ferro durante il ciclo catalitico, infatti è stato ipotizzato che il ferro ossidato venga rigenerato dall'ascorbato e in condizioni di stress ossidativo questa rigenerazione può

venire meno portando all'inattivazione dell'enzima e ad un aumento dei livelli globali di 5-metilcitosina (5-mC) (Niu Y. et al. 2015).

Le modificazioni post traduzionali degli istoni, come acetilazione e metilazione, rappresentano un ulteriore livello di complessità per la regolazione della struttura della cromatina e lo stress ossidativo influenza i PTM in vari modi agendo quindi su una serie di processi regolati dalla cromatina (Bannister A. et al. 2011).

In particolare, è stato dimostrato che lo stress ossidativo è un potente modulatore della funzione delle HDAC (istone deacetilasi) enzimi che si occupano di controllare l'acetilazione dei residui di lisina sulla coda dell'istone (Doyle K. et al. 2010).

Recentemente gli istoni sono stati identificati come bersagli del metilgliossale, che a differenza di molti PTM istonici, causa modificazioni che non sono limitate alle code NH₂-terminali , ma si trovano in residui coinvolti sia nella stabilità del nucleosoma che nel legame del dominio di lettura in prossimità del DNA. Queste modifiche, quindi, possono portare ad un aumento della dinamica della cromatina e poiché i cambiamenti epigenetici costituiscono la base di molte malattie, l'esistenza di queste modificazioni può avere implicazioni di vasta portata per il controllo dell'espressione genica e della trascrizione delle proteine.

L'MGO diffondendo facilmente attraverso la membrana nucleare può causare modifiche a livello del DNA e sebbene le conseguenze biologiche degli addotti di DNA derivati da MGO non sono ancora completamente chiare, la presenza di queste modificazioni può comportare un numero maggiore di rotture del filamento di DNA, legami DNA-DNA e legami DNA-proteina (Schalkwijk C. et al. 2019).

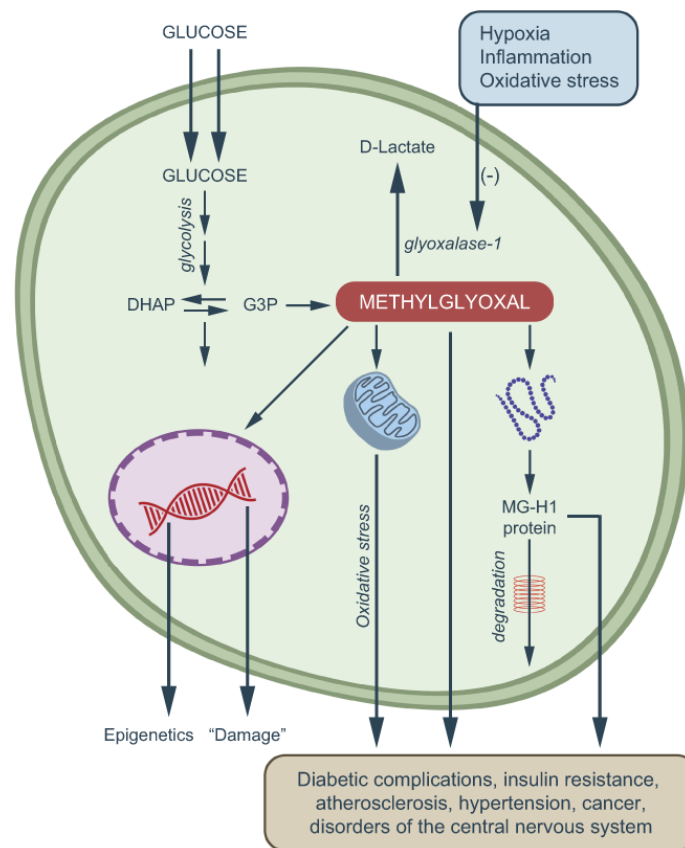


Figura 4: I principali bersagli del metilgliosale sono proteine e acidi nucleici con conseguente formazione di AGE e addotti di DNA che possono essere responsabili della patogenesi di varie patologie

2.1.5. Effetti fisio-patologici della glico- ossidazione a livello intestinale

Negli ultimi decenni, la ricerca ha fatto particolarmente attenzione al coinvolgimento dello stress glico-ossidativo in numerosi processi patologici come malattie polmonari, epatiche, cancro e malattie croniche degenerative. Inoltre, si è visto che questi stati patologici hanno un'incidenza crescente con l'età e si ritiene che lo stress ossidativo sia un fattore importante nell'invecchiamento e nelle malattie ad esso associate. Pertanto, i marcatori di stress ossidativo sono strumenti importanti per valutare lo stato di ossidoriduzione biologico, lo stato della malattia e la progressione, nonché gli effetti benefici degli antiossidanti nell'uomo (Remigante A. et al. 2022).

L'intestino è l'unico organo completamente differenziato, con un frequente turnover delle cellule che lo costituiscono, gli enterociti. Ogni 48-72 h le cellule dell'epitelio intestinale vengono rinnovate per espletare al meglio la propria funzione in quanto rappresentano una potente barriera contro gli agenti tossici luminali (Miller D. et al. 1977).

L'epitelio intestinale fa da interfaccia tra un organismo e il suo ambiente luminale e gli enterociti sono continuamente esposti non solo ai nutrienti introdotti con la dieta, ma anche ad agenti ossidanti, prodotti della perossidazione lipidica, composti di glicazione (AGEs) mutageni e cancerogeni presenti negli alimenti ingeriti (Ames B. 1983).

E' stato dimostrato che gli AGE e i prodotti di ossidazione presenti negli alimenti possono essere assorbiti a livello intestinale e aumentare i livelli di AGE nel torrente ematico e a livello intracellulare causando stress ossidativo, infiammazione e conseguenti danni funzionali (Uribarri J. et al. 2005).

Inoltre, i microorganismi della flora intestinale, la normale produzione di acidi gastrici, il consumo di alcuni farmaci ed errate abitudini alimentari possono promuovere la produzione di radicali liberi da parte delle cellule intestinali.

In condizioni fisiologiche, i ROS esercitano effetti regolatori sulle funzioni cellulari tra cui proliferazione, differenziazione, migrazione e sopravvivenza. L'integrità della mucosa viene mantenuta dallo stato redox luminale delle coppie glutatione/glutatione disolfuro (GSH/GSSG) e cisteina/cistina (Cys/CySS), che supportano anche l'assorbimento dei nutrienti luminali, la fluidità del muco e un microbiota diversificato. Il controllo dell'equilibrio redox dell'epitelio intestinale è pertanto fondamentale per le funzioni di digestione e assorbimento proprie dell'intestino, oltre che per la proliferazione delle cellule staminali, l'apoptosi enterocitica apicale e per la risposta immunitaria intestinale (Magdalena L. et al. 2012). Tuttavia, un persistente squilibrio tra la generazione di ROS e la capacità di un sistema biologico di disintossicarli porta all'interruzione della segnalazione/controllo redox e/o danno molecolare (Nurbubu T. et al. 1019).

Recenti studi hanno dimostrato che la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e le alterazioni dei meccanismi di difesa antiossidante e quindi uno squilibrio redox, svolgono un ruolo chiave nei meccanismi molecolari alla base dei processi infiammatori nella mucosa intestinale e dello sviluppo di malattie infiammatorie intestinali (IBD).

Le forme principali sono rappresentate dal morbo di Crohn e coliti ulcerose, disturbi cronici di eziologia multifattoriale, che colpiscono principalmente il tratto gastrointestinale (GI) e caratterizzati da un'inflammatione recidivante e remittente che interessa tutto l'intestino o parte di esso (Halpin S. et al. 2012).

Nello specifico il morbo di Crohn è caratterizzato da un'inflammatione trasmurale; quindi, localizzata in tutti gli strati dell'intestino e può manifestarsi in ogni regione del tratto gastrointestinale (Indriolo A. et al. 2011).

La colite ulcerosa invece colpisce le regioni del colon e del retto ma l'inflammatione è localizzata solo a livello della mucosa (Grivennikov S. 2013).

Queste patologie, presentandosi in modo ciclico, con l'alternarsi di episodi acuti seguiti da successiva remissione clinica mostrano che c'è una forte correlazione tra le IBD e l'insorgenza del cancro al colon-retto (Greco C. et al. 2011).

Sebbene sia ampiamente riconosciuto che le IBD siano patologie ad eziologia multifattoriale, i meccanismi attraverso cui si instaurano sono ancora da chiarire. Sicuramente tra i fattori influenti troviamo la predisposizione genetica, la disregolazione del sistema immunitario, fattori ambientali e lo stress ossidativo (Hibi T. et al. 2006).

L'alterazione dello stato redox cellulare induce l'attivazione di processi infiammatori che iniziano con l'adesione dei neutrofili all'endotelio vascolare e la distruzione della mucosa a causa del rilascio di agenti ossidanti e proteasi (Devarajan A. et al. 2014). Le specie reattive dell'ossigeno danneggiano le proteine cellulari, comprese quelle del citoscheletro, e distruggono la barriera gastrointestinale aumentandone la permeabilità. Inoltre, livelli eccessivi di ROS inducono infiammazione stimolando le cellule polimorfonucleate (PMN) del sistema immunitario che a loro volta provocano danno tissutale.

In particolare, l'aumento della risposta infiammatoria e del danno tissutale, causato dal reclutamento dei neutrofili avviene grazie all'attivazione dei pathway di signalling come il fattore nucleare-kappa B (NF- κ B) (Brennan F. et al. 1995).

Quando è attivato, NF- κ B trasloca nel nucleo e si lega al DNA (figura 5), attivando così l'espressione genica di alcuni geni coinvolti nell'infiammazione come ad esempio il TNF- α . (Yasukawa K. et al. 2012).

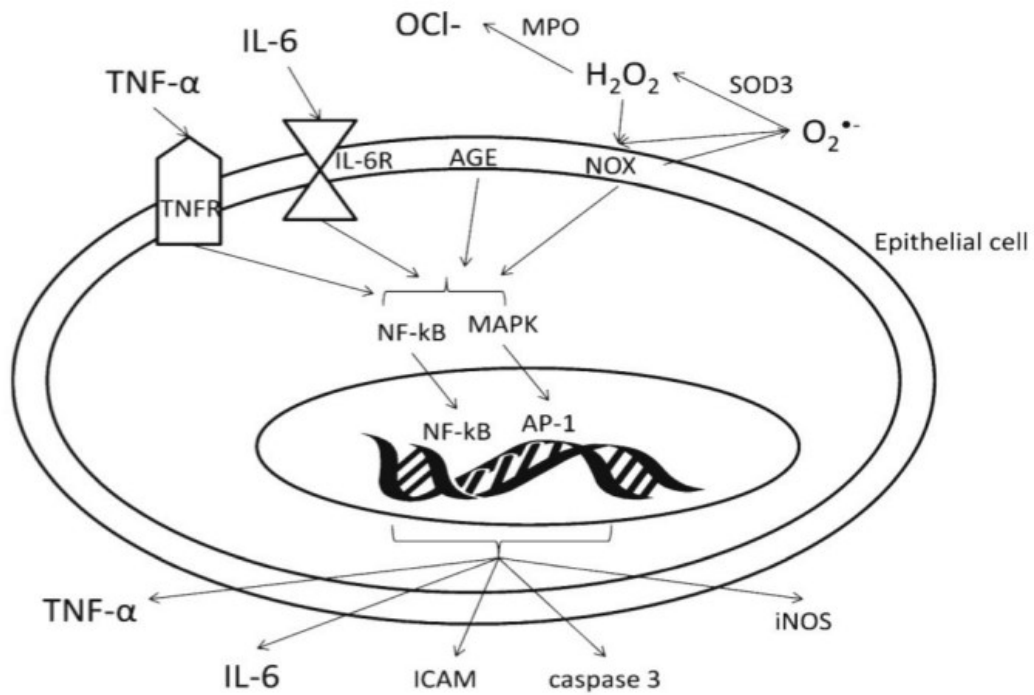


Figura 5: l'influenza dei ROS e delle citochine sulle vie di segnale nelle cellule intestinali epiteliali

Lo stress ossidativo, quindi, rappresenta solo il primo step per lo sviluppo di una grande varietà di patologie intestinali. L'intestino, tuttavia, possiede vari sistemi antiossidanti endogeni che concorrono a proteggere gli enterociti e a mantenere l'integrità della mucosa intestinale come ad esempio il sistema

GSH/GSSG, infatti è stato visto che l'attenuata proliferazione dei linfociti T a livello della lamina propria, è correlata a bassi livelli intracellulari di GSH (Sido B. et al. 2008).

Oltre ai sistemi antiossidanti endogeni, alla protezione delle cellule intestinali, concorrono anche sistemi antiossidanti esogeni. Infatti, è stato ampiamente dimostrato come una grande varietà di molecole bioattive introdotte con la dieta possono esercitare un effetto antiossidante nei confronti dei radicali liberi che possono minare ai meccanismi di difesa intestinali e quindi causare infiammazione e danno cellulare.

2.2 Sistemi di difesa antiossidanti nel tratto gastrointestinale

Come descritto nei capitoli precedenti, i ROS sono un'arma a doppio taglio. Sebbene a concentrazione moderata possono agire come secondo messaggero per la regolazione fisiologica, un'eccessiva concentrazione può sopraffare la capacità antiossidante della cellula e innescare la morte cellulare. L'omeostasi redox cellulare è assicurata mantenendo l'equilibrio tra la generazione e l'eliminazione di ROS (Bowen Y. et al 2019).

Come tutte le cellule del nostro organismo anche le cellule intestinali hanno dei meccanismi di difesa antiossidante presenti all'interno della cellula che includono enzimi quali la catalasi, la superossido dismutasi e la glutatione perossidasi; tra i meccanismi non enzimatici vi sono, ad esempio, il glutatione di origine endogena e i polifenoli di origine esogena. Essi lavorano sinergicamente in combinazione con altri sistemi di protezione cellulare contro il danno (figura 6) . Nella tabella 2 sono riportati i principali sistemi di difesa antiossidanti umani che includono antiossidanti endogeni (enzimatici e non) ed esogeni, provenienti principalmente dalla dieta (Jaouad B. et al. 2010).

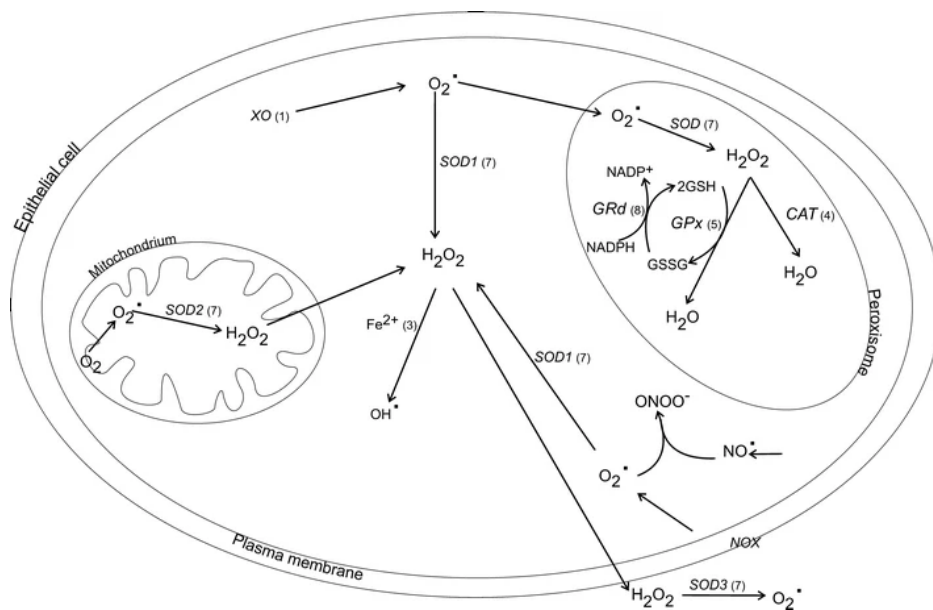


Figura 6 : Formazione di ROS e sistema di difesa antiossidante nelle cellule epiteliali intestinali

ANTIOSSIDANTI ENDOGENI	ANTIOSSIDANTI ESOGENI
<p><u>Antiossidanti enzimatici</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Superssido dismutasi (SOD): enzima disintossicante radicale superssido (O_2) • Catalasi (CAT) e glutazione perossidasi (GPx): enzimi coinvolti nella detossificazione dei perossidi (CAT contro H_2O_2 che $ROOH$) • Glutazione riduttasi: enzima coinvolto nella rigenerazione del glutazione • Tiorredossina riduttasi: enzima coinvolto nella protezione contro l'ossidazione delle proteine • Glucosio-6-fosfato deidrogenasi: enzima coinvolto nella rigenerazione del NADPH <p><u>Antiossidanti non enzimatici (principali agenti riducenti intracellulari)</u></p> <p>Glutazione (GSH), acido urico, acido lipoico, NADPH, coenzima Q, albumina, bilirubina</p>	<p><u>Principali antiossidanti dietetici da frutta, verdura e cereali</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Vitamine: vitamina C, vitamina E • Oligoelementi: zinco, selenio • Carotenoidi: β-carotene, licopene, luteina, zeaxantina • Acidi fenolici: acidi clorogenici, acido gallico, acido cafeico, ecc. • Flavonoli: quercetina -*, kaempferol -*, miricetina -* • Flavonoli: proantocianidine e catechine • Antocianidine: cianidina -* e pelargonidina * • Isoflavoni: genisteina -*, daidzeina -* e gliciteina* • Flavanoni: naringenina -*, eriodictyol -*, ed esperetina -* • Flavoni: luteolina -* e apigenina -*

Tabella 2 : Sistemi di difesa antiossidante (* e i loro glucosidi)

2.2.1 Sistemi di difesa endogeni

Nei mammiferi la superossido dismutasi (SOD) è un enzima appartenente alla famiglia delle metalloproteine che si presenta in tre isoforme: la SOD1 è distribuita nel citoplasma e contiene rame/zinco nel suo centro di reazione, la SOD2 è presente nei mitocondri e contiene nel suo centro di reazione il manganese, mentre la SOD3 localizzata a livello extracellulare contiene rame e zinco come ioni nel sito attivo. La reazione che catalizza questo enzima porta alla detossificazione dell'anione superossido riducendolo ad H_2O_2 .

La SOD1, la più espressa, converte anche il perossido di idrogeno in presenza degli ioni rame formando lo ione idrossido. I tessuti intestinali dei pazienti con IBD hanno aumentati livelli di tutte e tre le isoforme, soprattutto a livello dell'epitelio (Kruidenier L. et al. 2003). L' H_2O_2 viene poi convertita in H_2O dalla catalasi, altro enzima antiossidante. La catalasi è anch'essa una metalloproteina, ampiamente espressa nel citoplasma e nei perossisomi, il cui gruppo prostetico è rappresentato dal ferro (Izawa S. et al. 1996). Questi enzimi proteggono i tessuti dai perossidi e decompongono l' H_2O_2 in H_2O ed O_2 . A livello intestinale la catalasi è maggiormente espressa nell'epitelio e nella lamina propria del colon e si attiva soprattutto in presenza di processi infiammatori.

Un altro enzima antiossidante è la glutazione perossidasi (GPx), di cui ne esistono cinque isoforme espresse in misura maggiore in strati differenti dell'intestino. Agisce in associazione con il glutatione, una molecola presente ad alte concentrazioni nelle cellule e che usa come substrato l' H_2O_2 o un perossido organico (ROOH), catalizzando la conversione dei perossidi ad acqua o alcol e contemporaneamente ossidando il glutatione (Valko M. et al. 2006; Rahman K. 2007)

Il GSH nella sua forma ridotta è uno degli antiossidanti non enzimatici tiolici più importanti. Viene prodotto a livello intracellulare ed è un tripeptide idrosolubile composto da glutammina, cisteina e glicina che contiene al suo interno un gruppo tiolo (SH) derivato dalla cisteina. Questo gruppo tiolico determina la capacità antiossidante della molecola, in quanto l'atomo di zolfo può favorire la perdita di un singolo elettrone. La specie radicalica così generata (GS^\cdot) può dimezzare per formare il prodotto non radicalico (GSSG). Il glutatione ossidato si accumula all'interno delle cellule e il rapporto

GSH/GSSG è un buon indice di stress ossidativo di un organismo (Valko M. et al. 2006). Invece la perdita del bilancio redox di GSH/GSSG contribuisce all'infiammazione mucosale e ad instaurare i sintomi delle coliti (Tsunada S. et al. 2003).

2.2.2 Sistemi di difesa esogeni

La dieta può svolgere un ruolo importante nel mantenimento dello stato redox intestinale (figura 7). Una dieta equilibrata composta da cereali integrali, verdura, frutta contribuisce ad un minor apporto di AGEs, MGO e prodotti di perossidazione e un elevato apporto di molecole ad azione antiossidante che svolgono un ruolo protettivo contro i danni indotti dalla glico-ossidazione. Al contrario una dieta ricca di zuccheri semplici e alimenti trasformati alto indice glicemico, contribuisce ad apportare AGEs, MGO e prodotti di perossidazione lipidica coinvolti nell'innescò di processi pro-infiammatori sia diretti che indiretti a livello intestinale (Hernandez-Castillo C. et al. 2001).

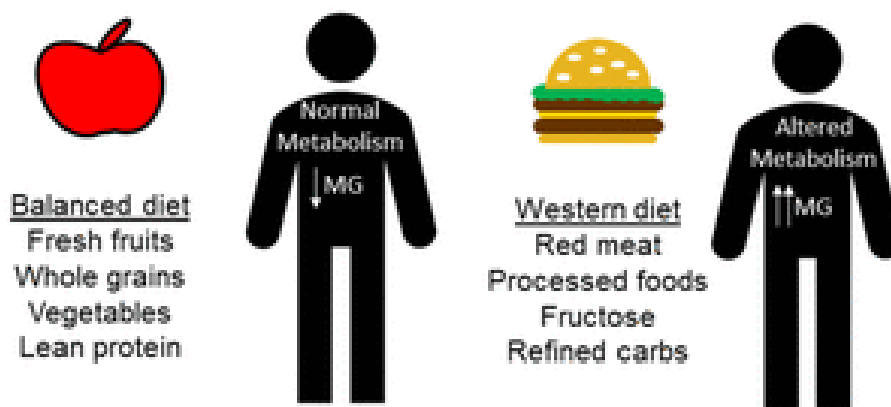
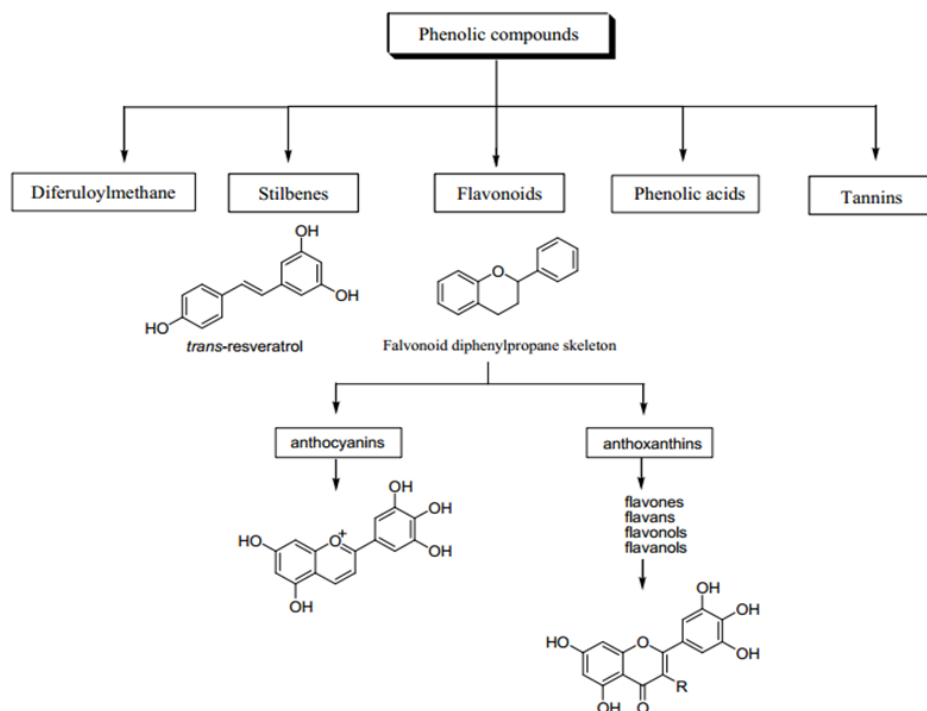


Figura 7: La dieta influisce sulla produzione di MGO e sul rischio di malattie

Tra gli antiossidanti non enzimatici di origine esogena vi è la **vitamina C o acido ascorbico**, una molecola idrosolubile che può essere presente in due forme: una ridotta (acido ascorbico) ed una ossidata (acido deidroascorbico) tra loro convertibili. Essa è importante sia nel plasma che nelle cellule con la funzione di scavenger e per la rigenerazione della **vitamina E**. Quest'ultima è potente antiossidante liposolubile, il cui ruolo principale è quello di proteggere le membrane lipidiche dalla perossidazione, prevenendo l'ossidazione degli acidi grassi insaturi. Infine tra gli antiossidanti non enzimatici ritroviamo i **polifenoli**.

I polifenoli sono un gruppo di metaboliti secondari abbondanti in frutta e verdura. Attualmente sono note oltre 8000 strutture fenoliche che comprendono un ampio spettro di sostanze molto eterogenee ma tutte caratterizzate dalla presenza di un anello aromatico con uno o più sostituenti ossidrilici. Possono essere suddivisi in diverse sottoclassi in base al numero di anelli fenolici presenti nella loro struttura, agli elementi strutturali che legano questi anelli tra di loro, e ai sostituenti legati agli anelli (Figura 8).



Classe	Sostanza	Alimento
Isoflavoni	Genisteina Daidzeina	Soia Soia
Flavoni	Rutina Luteolina Crisina Apigenina Esperedina Tangeretina	Cipolla, mela, uva, broccoli e tè Limone, olive e sedano Buccia della frutta Sedano e prezzemolo Arance Agrumi
Flavonoli	Quercetina Miricetina Kemferolo	Tè, cipolle, broccoli, fagioli, cereali, mele e uva Uva Indivia, broccoli e tè
Antocianine	Enina Cianidina Delfinidina	Uva nera e vino rosso Uva, lamponi e fragole Melanzane
Flavanoli	Catechine Epicatechina Epigallocatechine	Mele, tè, vino e cioccolata Uva nera e vino rosso Mele, tè, vino e cioccolata
Flavanoni	Naringinina Taxifolina	Buccia degli agrumi Agrumi

Figura 8 : Composti fenolici e relative sottoclassi

Le diverse caratteristiche strutturali si riflettono nella loro attività biologica, infatti sono numerosi i meccanismi molecolari mediante i quali i polifenoli esplicano la loro azione protettiva. Negli ultimi anni questi composti bioattivi hanno riscosso notevole interesse grazie alla vasta gamma di attività biologiche e il loro possibile ruolo nella prevenzione di patologie, in particolare tumori, malattie cardiovascolari e malattie neurodegenerative (Carrasco-Pozo C. et al. 2011; Duthie G. et al. 1994).

Tra i principali ruoli protettivi esercitati dai polifenoli vi è l'effetto antiossidante, ossia la capacità dei fitonutrienti di proteggere le molecole biologiche dal danno ossidativo. (Marrugat J. et al. 2004; Covas M. et al. 2011). Inoltre sembrerebbero implicati nella modulazione del sistema della detossificazione endogena, nella regolazione dell'espressione genica, comune ai meccanismi di proliferazione cellulare e apoptosi e nel metabolismo ormonali (Celli A. et al. 1998).

Recentemente è stato dimostrato che i polifenoli svolgono anche un ruolo nell'inibizione della glicazione non enzimatica. Questo è stato possibile grazie a studi condotti *in vitro* simulando le condizioni delle proteine in un ambiente iperglicemico utilizzando zuccheri riducenti come fruttosio, glucosio, treosio, ribosio o carbonili, come il metilgliosale.

Sebbene i meccanismi molecolari alla base dell'effetto protettivo dei polifenoli contro la glicazione non enzimatica non siano completamente chiariti, sono state formulate alcune ipotesi.

Tra queste c'è la possibile inibizione della formazione di ROS e riduzione della formazione di dicarbonili e AGEs, l'inibizione della formazione dei prodotti di Amadori e il "trapping" dei dicarbonili .

La formazione di dicarbonili durante la reazione di Maillard è legata alla presenza di ROS; pertanto, l'azione protettiva dei polifenoli nei confronti della formazione di AGEs è legata alle loro proprietà antiossidanti. Diversi studi hanno dimostrato che alcuni fitocomposti possono inibire la glicazione non enzimatica interagendo con i prodotti reattivi che si formano durante la reazione di Maillard, come i dicarbonili, impedendo quindi la propagazione della reazione (Wu CH et al. 2011; Shao et al. 2008).

Nello specifico nel il mio lavoro di tesi, per dimostrare l'effetto protettivo dei polifenoli nei confronti dell'MGO sono stati utilizzati i polifenoli estratti dai tepali della fiore del *Crocus sativus*.

2.3 *Crocus Sativus*: cenni generali

Il *Crocus Sativus*, noto come zafferano, è una pianta formata da sette petali, tre stami gialli, bulbo, che rappresentano il materiale di scarto, e stimmi i quali sono l'unica parte commercializzata (Giorgi C. et al. 2015). Il fiore è incorniciato da foglie strette 5 mm e lunghe 30-50 cm.



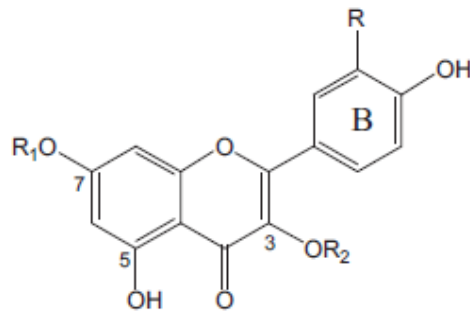
Figura 9: Pianta di Crocus sativus

La pianta presenta un corredo cromosomico triploide, la cui struttura genetica non gli consente di produrre semi e di conseguenza lo zafferano può riprodursi solo per via agamica attraverso la moltiplicazione bulbo-tuberi.

Il suo ciclo biologico può essere suddiviso in due stadi: una fase attiva che riguarda il periodo compreso tra Settembre e Maggio e una fase di riposo che intercorre fra Giugno Agosto . Il *Crocus sativus* durante l'estate perde le foglie e si conserva in forma quiescente come bulbo-tubero. Nelle prime settimane di Ottobre inizia la fase di fioritura che dura qualche settimana.

Tradizionalmente solo gli stammi dello zafferano venivano raccolti, essiccati ed usati come spezie, mentre le parti rimanenti del fiore, che rappresentano il 90% della pianta, venivano scartate.

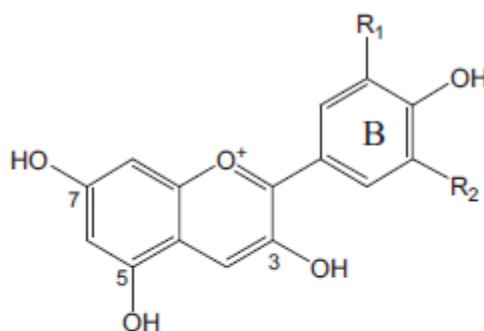
I tepali costituiscono il sottoprodotto più abbondante della coltivazione di *Crocus sativus*. Tra i principali composti biologicamente attivi riscontrati nei tepali troviamo numerosi flavonoidi (kaempferolo, rutina, quercetina, luteolina, esperidina, antocianine) e tannini (Shahi T.et al. 2016). I glicosidi di kaempferolo costituiscono l'84% del contenuto totale di flavonoli, mentre quelli di quercetina e di isoramnetina ne rappresentano rispettivamente il 9,3% e l'8,7% (Figura 10) (Goupy P. et al. 2013).



FLAVONOLI	R	R ₁	R ₂
Kaempferolo	H	H o glicosile	H o glicosile
Quercetina	OH	H o glicosile	H o glicosile
Isoramnetina	OCH ₃	H o glicosile	H o glicosile

Figura 10: Struttura dei flavonoli identificati nei tepali

Le antocianine (Figura 11) sono i composti responsabili del colore violetto dei tepali e il loro contenuto totale nei tepali si aggira attorno ai $4804 \pm 233 \mu\text{g/g}$ di peso secco, di cui l'80% sarebbe rappresentato da delfinidina-3,7-O-diglucoside. (Goupy P. et al. 2013)



ANTOCIANINE	R ₁	R ₂
Delfinidina	OH	OH
Petunidina	OH	OCH ₃
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃

Figura 11: Struttura delle antocianine identificate nei tepali

In un recente studio (Bellachioma L. et al. 2022), sfruttando un approccio metabolomico, è stata chiarita la composizione in polifenoli sia dei tepali che degli stigmi di *Crocus sativus* (figura 12). Il contenuto fenolico totale è risultato più elevato nei tepali (46.92 mg/g) che negli stigmi (25,22 mg/g); tuttavia, questi ultimi presentano un maggiore contenuto di lignani e di fenoli a basso peso molecolare rispetto ai tepali.

Classe	Stigmi	Tepali
Antocianine	4.6±0.8	34.6±3.5**
Flavonoli	0.3±0.1	2.0±0.0**
Flavan-3-oli	0,1±0.0	0.4±0.2
Altri flavonoidi	0.6±0.1	2.3±0.2**
Lignani	8.9±2.9	1.8±0.8*
Stilbeni	0.7±0.1	0.1±0.00
Acidi fenolici	0.7±0.1	0.9±0.1
Altri fenoli	9.8±1.0	4.8±0.4**
Terpenoidi	0.6±0.2	0.2±0.1

*Figura 12: Confronto tra stigmi e tepali per quanto riguarda il contenuto di diverse sottoclassi di composti fenolici e il contenuto totale di terpenoidi; entrambi sono espressi come mg Eq/g peso secco. ** $p < 0.01$ vs estratti di stigmi; * $p < 0.05$ vs estratti di stigmi*

Recentemente la composizione fitochimica dei tepali ha ottenuto l'attenzione della comunità scientifica, per una potenziale applicazione in campo alimentare e sanitario (Tuberoso C. et al. 2015).

3. MATERIALI E METODI

3.1 Modello sperimentale: linea cellulare Caco-2

Per la messa a punto del modello è stata utilizzata una linea cellulare tumorale umana, le Caco-2, cellule di adenocarcinoma colon rettale (figura 13).

Queste cellule si differenziano formando un epitelio continuo con giunzioni strette funzionali e microvilli a livello apicale (orletto a spazzola) (Pinto M. et al. 1983). Il monostrato cellulare fornisce una barriera fisica e biochimica al passaggio di ioni e piccole molecole; inoltre separa il modello in due comparti ben distinti: uno apicale, corrispondente al lume intestinale in vivo e uno basolaterale che corrisponde al comparto della circolazione sanguigna e linfatica dell'organismo. Con il modello delle Caco-2 si sono trovati valori di permeabilità che correlano bene con i dati umani di assorbimento in vivo per farmaci, sostanze chimiche e piccole molecole come il glucosio. Per tale motivo questa linea cellulare viene riconosciuta come un modello adatto per valutare l'effetto dei componenti nutrizionali.

Le cellule sono state fatte crescere all'interno di fiasche T75 in adesione e mantenute in terreno D-MEM (Dulbecco-Modified Eagle's Medium) complementato con 10% di FBS "Fetal Bovine Serum, 5mM di glutammina e 100 U/ml di penicillina/streptomicina.

Il mantenimento avviene in termostato a 37°C con 5% CO₂ e 95% di aria atmosferica in ambiente umidificato. Il cambio del terreno è stato effettuato ogni 2 giorni. Una volta raggiunta la confluenza (in condizioni ottimali i tempi di crescita sono di circa una settimana) le cellule verranno staccate dalla fiasca T75 dopo un lavaggio in PBS e per azione della tripsina (5 minuti a 37 °C, 5% CO₂).

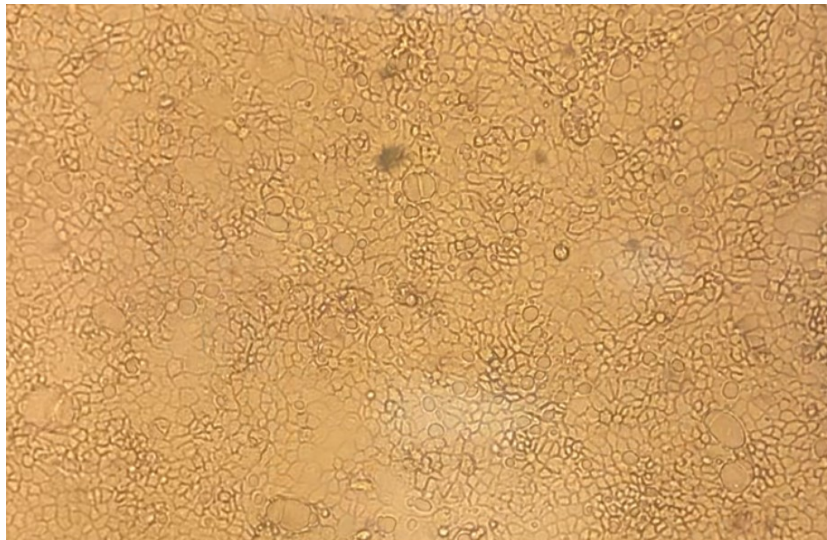


Figura 13: Cellule Caco-2

3.1.1 Trattamento delle cellule con MGO

Le cellule Caco-2 sono state seminate in una 12 well all'interno del quale avremo una concentrazione pari a 250.000 cellule per ogni pozzetto. Una volta raggiunta la confluenza si procede con il trattamento con MGO (Methylglyoxal solution Sigma- Aldrich).

La scelta della concentrazione e del time point deriva da una serie di esperimenti preliminari che ci hanno permesso di trovare le condizioni più adatte per questo modello sperimentale. Nella fase preliminare le cellule sono state incubate in presenza di crescenti concentrazioni di MGO (3 mM e 5 mM) per diversi tempi di incubazione (2h e 4h).

Al termine dell'incubazione il danno causato dallo stress glico-ossidativo è stato valutato mediante l'analisi al citofluorimetro e MitoSOX.

3.1.2 Trattamento delle cellule con polifenoli

Per valutare l'effetto protettivo dei fitocomposti nei confronti del danno glicossidativo le cellule Caco-2 sono state trattate con polifenoli estratti dai tepali del fiore del *Crocus sativus*.

Il trattamento necessita di una prima fase che prevede la preparazione dei campioni di polifenoli.

- *Preparazione tepali:*

L'Agraria Lorenzini (Ancona, Italy) ci ha gentilmente fornito i fiori di scarto derivati dalla mondatura dello Zafferano che sono stati accuratamente selezionati per ricavarne i tepali. Quest'ultimi sono stati congelati a -20° C e successivamente sottoposti alla liofilizzazione, un processo che ha come scopo l'eliminazione dell'acqua da una sostanza organica con il minimo deterioramento possibile della struttura e dei componenti della sostanza stessa. A questo punto i tepali risultano essere polverizzati e si procede con l'estrazione in acqua: 1,2 gr di polvere vengono sospesi in 50 ml di H₂O e l'estrazione avverrà overnight a 4°C. (figura14)



Figura 14: Pulizia e selezione dei tepali (sinistra) necessaria per ottenere l'estratto in acqua (destra)

- Estrazione in fase solida (SPE) :

L'estrazione in fase solida è una forma di cromatografia liquida utilizzata nell'elaborazione dei campioni per isolare selettivamente i costituenti di interesse da altri composti che potrebbero interferire con l'analisi (Lane C. et al. 2017). Questa tecnica sfrutta la differenza di affinità tra un analita e gli interferenti, presenti in una matrice liquida, per una fase solida (sorbente).

Un'estrazione in fase solida prevede quattro fasi fondamentali:

- Condizionamento della cartuccia
- Passaggio della soluzione contenente l'analita attraverso la fase solida affinché le impurità vengano trattenute sul sorbente

- Lavaggio del sorbente per rimuovere le impurità
- Raccolta dell'analita.

Per questo lavoro sono state utilizzate cartucce SPE, Chromabond, Poliammide 6, 3 ml, PP, 500 mg. (Figura 15). Il condizionamento, l'estrazione e la successiva raccolta sono stati eseguiti secondo il protocollo che prevede:

- 5ml di Esano
- 5ml Metanolo
- 10 ml Acqua distillata
- 30 ml della soluzione contenente l'analita con pH 3
(5ml di campione di tepali + 25 ml di acqua)
- 8 ml di una soluzione metanolo e acqua in rapporto 1:9 a pH3
- 4 ml Metanolo



Figura 15: Cartucce SPE, Chromabond, Poliammide durante la fase di condizionamento necessaria per l'estrazione SPE

Una volta terminati questi passaggi si procede con la raccolta dell'estratto in delle eppendorf che verranno poi messe in uno SpeedVac per circa 6 ore per l'evaporazione del metanolo. A questo punto in ogni eppendorf avremo un concentrato di polifenoli che sarà raccolto in un'unica eppendorf con 200 μ L di acqua distillata. (Figura 16)

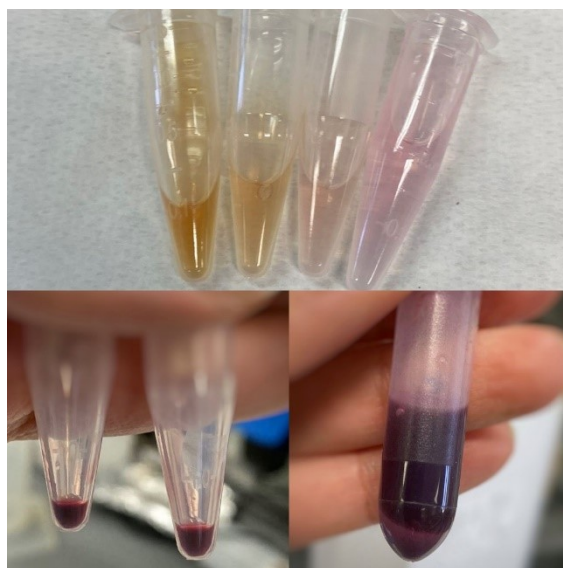


Figura 16: Fasi di raccolta del concentrato di polifenoli

- *Valutazione dei polifenoli totali*

Per la quantizzazione dei polifenoli da utilizzare nei vari trattamenti è stata effettuata con una valutazione colorimetrica, utilizzando il metodo di Folin-Ciocalteu. Come standard è stato usato l'acido gallico (GA), un composto fenolico con azione antiossidante.

Il principio di questo metodo è basato sulla capacità del reattivo di Folin-Ciocalteu di ossidare i composti fenolici, producendo un picco di assorbimento a 765nm. Il reattivo è costituito da una miscela in soluzione acquosa di fosfomolibdato e fosfotungstato. L'assorbanza, misurata a 765nm, è direttamente proporzionale al contenuto di composti fenolici totali presenti nel campione. I risultati vengono espressi in mg di acido gallico equivalenti (GAE mM). L'acido gallico è un polifenolo appartenente alla sottoclasse degli acidi fenolici che viene utilizzato per realizzare una retta standard (figura17) fondamentale per la quantificazione dei polifenoli (Carrieri M. et al. 2016).

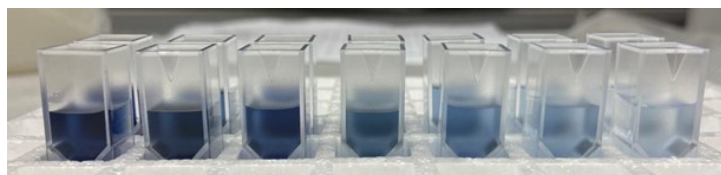


Figura 17: Esempio di retta standard utilizzata per la lettura allo spettrofotometro nella quantizzazione dei polifenoli totali

E' stata eseguita la procedura descritta in letteratura (Bacchetti T. et al. 2020), che prevede:

1) Soluzione stock standard: Acido Gallico esaidrato (0.0068 g Acido Gallico + 2 mL di acqua). Utilizzata per costruire la retta standard con le concentrazioni: 8, 5, 2.5, 1.25 e 0.625 mM.

2) Soluzione di carbonato di sodio Na_2CO_3 (20% p/v).

L'estratto di tepali è stato diluito in rapporto 1:5 e a questo punto si può procedere con la preparazione dei campioni da quantizzare.

Sono stati utilizzati dei tubi nel quale inseriamo: 1580 μL di H_2O , 20 μL di campione diluito o acido gallico, 100 μL di Folin ed infine 300 μL di Na_2CO_3 (20%).

Successivamente i preparati sono stati: vortexati per qualche secondo, incubati in bagnetto termostato per 30 minuti a 40 °C (la soluzione assume un colore blu-viola) e sottoposti a lettura dell'assorbanza allo spettrofotometro a 765 nm, utilizzando delle cuvette.

Riportando i valori in funzione dell'equazione della retta ($y=mx+q$) si calcola la concentrazione dei polifenoli contenuti nell'estratto. I risultati ottenuti sono la media di tre esperimenti eseguiti in triplicato.

- *Trattamento*

Terminata la fase di estrazione dei polifenoli si procede con il trattamento delle cellule Caco-2 che sono state seminate all'interno di una 24 well.

Anche in questo caso la messa a punto del modello ha richiesto una serie di esperimenti preliminari che hanno permesso di capire qual era la giusta concentrazione di polifenoli da utilizzare per il trattamento. Sono state fatte prove con concentrazioni pari a 30- 50- 100 $\mu\text{g/ml}$ di polifenoli.

La condizione migliore per questo esperimento è stata ottenuta utilizzando una quantità di estratto di tepali che contenesse una concentrazione di polifenoli pari a 100 $\mu\text{g/ml}$ e per quanto riguarda l'MGO la concentrazione è sempre di 3 μM .

Le condizioni di trattamento saranno 4:

- Cellule non trattate (controllo)
- Cellule trattate con MGO
- Cellule trattate con polifenoli
- Cellule trattate con MGO + polifenoli

Trascorse le due ore di incubazione si procede con l'analisi al citofluorimetro per andare a valutare gli effetti protettivi che i polifenoli hanno nei confronti del danno glico-ossidativo.

3.2 Valutazione del danno glico- ossidativo: analisi della citometria a flusso

I livelli di ROS citosolici, mitocondriali e l'apoptosi sono stati valutati mediante citometria a flusso. Questa è una tecnica che permette la caratterizzazione quantitativa e qualitativa di una sospensione cellulare e il principio sul quale si basa è la dispersione della luce. Il citometro a flusso, chiamato così perché le cellule fluiscono velocemente e singolarmente attraverso il raggio di luce che le colpisce, misura contemporaneamente alcuni parametri derivati dall'attraversamento delle cellule da parte del fascio di luce laser.

Le sonde fluorescenti specifiche che sono state utilizzate per quest'analisi sono state quantificate mediante il citometro a flusso (Guava EasyCyte) con il software GuavaSoft 2.7 (Merck Millipore, Darmstadt, Germania). Come sorgente eccitante è stato utilizzato un laser di λ 488nm e l'intensità della fluorescenza emessa è stata registrata in canali diversi su una media di 5000 cellule per ciascun campione.

3.2.1 Analisi dei ROS citoplasmatici

I livelli di ROS intracellulari sono stati valutati utilizzando la sonda carbossi-2,7-diclorofluoresceina diacetato (carbossi- H_2 DCFDA) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (Cianfruglia L. et al. 2020). Il probe è una molecola non polare lipofila che diffonde facilmente attraverso la membrana cellulare. All'interno della cellula la H_2 DCFDA viene idrolizzata dalle esterasi intracellulari che rimuovono i gruppi acetati rendendola polare e idrofila (H_2 DCF, Diidrodiclorofluoresceina), quindi, non più in grado di diffondere attraverso la membrana cellulare, si accumula a livello intracellulare. La H_2 DCFDA è un fluorocromo non fluorescente, tuttavia se viene ossidato da specie ossidanti, quali i ROS, viene convertita in 2',7'-diclorofluoresceina (DCF), molecola invece altamente fluorescente (figura 18). I livelli di fluorescenza sono proporzionali alla quantità di specie reattive dell'ossigeno intracellulari. La DCF, molecola in forma ossidata, emette fluorescenza ad una lunghezza d'onda di 532 nm, regione del verde.

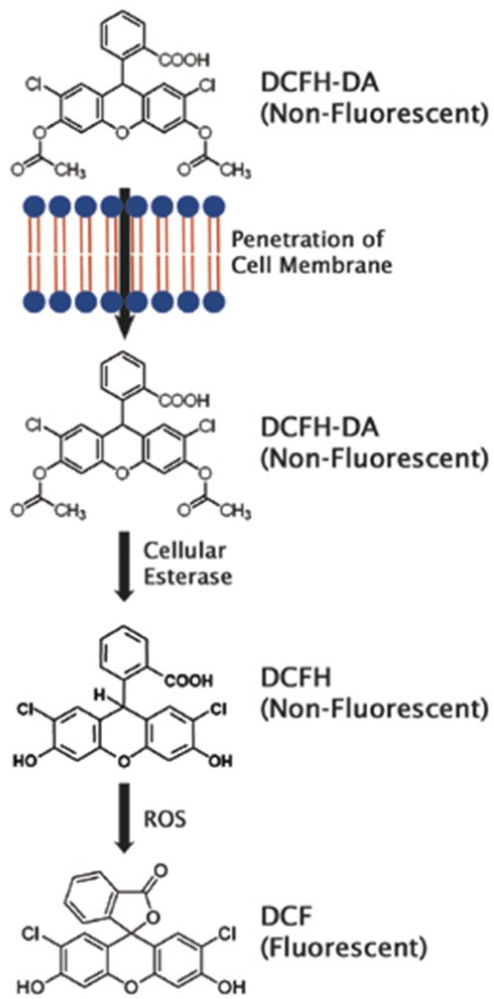


Figura 18: Meccanismo d'azione della Carbossi- H_2 DCFDA (5-(e 6)-carbossi-2',7'-diclorodihidrofluoresceina diacetato

Dopo il trattamento, il terreno presente in ogni pozzetto viene eliminato e le cellule vengono risospese in 250 μ l di carbossi-H₂ DCFDA a concentrazione 1 μ M e incubate a 37 °C per 30 minuti al buio.

Dopo l'incubazione le cellule vengono lavate con PBS, staccate con 200 μ l di tripsina per 5 min che verrà poi neutralizzata con 1ml di DMEM. A questo punto il terreno contenente le cellule viene raccolto in delle falcon per procedere con la centrifugazione a 800 rpm per 10 min.

50 μ L di sospensione cellulare verranno trasferiti in delle eppendorf con 200 μ L di sonda ViaCount Millipore opportunamente diluita secondo datasheet. Questa soluzione è la combinazione di due sonde capaci di discriminare le popolazioni di cellule vive, morte e apoptotiche. La sonda permeabile alla membrana plasmatica (che emette fluorescenza rossa) colora tutte le cellule nucleate, indipendentemente dalla vitalità della cellula e consente di discriminare i frammenti cellulari che risultano negativi. Il fluorocromo impermeabile alle membrane (fluorescente in giallo) entra solo nelle cellule morte o in procinto di morire con la membrana danneggiata, diversi livelli di fluorescenza gialla consentono di distinguere le cellule morte dalle apoptotiche. Una colorazione intermedia è indice di una alterazione delle membrane compatibile con i primi stadi di apoptosi.

L'analisi dei ROS e dell'apoptosi/vitalità sono state condotte simultaneamente in citometria a flusso impiegando una tripla colorazione. L'utilizzo combinato delle due sonde fluorescenti ha lo scopo di valutare i livelli di ROS intracellulari solo nelle cellule vive. Perciò, è essenziale in questa analisi escludere le cellule con la membrana cellulare compromessa, poiché la fuoriuscita della DCF dalle cellule morte o con membrana non integra, comporterebbe falsi negativi. Perciò, per l'analisi dei dati, sono state prima definite le cellule vive, apoptotiche e morte all'interno dei canali di fluorescenza giallo e rosso, in modo da poter analizzare il contenuto citosolico di ROS nelle sole cellule vive. Sono quindi state arbitrariamente definite all'interno del canale verde, usando come riferimento la distribuzione del controllo negativo le regioni "LOW" e "HIGH"

Le regioni prese in considerazione sono:

- Regione LOW ROS: regione che comprende il 50% delle cellule del controllo negativo con basso contenuto di ROS.
- Regione HIGH ROS: regione che comprende il 50% delle cellule del controllo positivo. L'accumulo di ROS è elevato.

3.2.2 Analisi dei ROS mitocondriali

L'identificazione dei ROS a livello mitocondriale è stata effettuata valutando la produzione dell'anione superossido, tramite citometria a flusso per mezzo della sonda MitoSOXTM - Indicatore di superossido mitocondriale rosso (Invitrogen). Questa sonda carica positivamente viene assorbito dai mitocondri delle cellule metabolicamente attive in fase di respirazione cellulare, e quando viene ossidato dall'anione superossido diviene fluorescente emettendo ad una lunghezza d'onda di 580nm, corrispondente allo spettro del giallo (Kauffman M. et al. 2016).

Dopo il trattamento le cellule Caco-2 sono state incubate con una soluzione 5 μ M di MitoSOX in DMSO per 15 min a 37°C al buio. Trascorso questo tempo le cellule sono state lavate in PBS, staccate con tripsina per 5 minuti e centrifugate a 800 rpm per 10 min. Una volta eliminato il surnatante una piccola aliquota di cellule sono state trasferite in eppendorf per poter procedere con la lettura al citofluorimetro a flusso Guava Easycyte (Millipore). Per l'analisi quantitativa della distribuzione della fluorescenza emessa, sono state arbitrariamente impostate due regioni corrispondenti a "LOW" e "HIGH" contenuto mitocondriale di ROS usando come riferimento il controllo negativo PG/VG . Gli stessi settaggi sono stati mantenuti per l'analisi di tutti gli esperimenti successivi.

3.3 Valutazione degli effetti della glico-ossidazione sull'espressione genica.

Al fine di valutare i meccanismi molecolari alla base del danno glico-ossidativo indotto da MGO nelle cellule Caco-2, sono state indagate le alterazioni dell'espressione di geni coinvolti nell'apoptosi (BAX, XIAP, Caspasi 3-7) , stress ossidativo (SOD, Catalasi) e infiammazione (TNF α) a seguito del trattamento.

Il coinvolgimento di alterazioni epigenetiche a seguito del trattamento con MGO è stato studiato mediante la valutazione dell'espressione di HDAC1-2-3-8, DNMT1-3a e i livelli proteici dell'Istone H4 acetilato.

Tale studio è stato condotto mediante l'analisi dei livelli di mRNA tramite PCR e mediante la valutazione dei livelli proteici mediante western blot.

3.3.1 Quantificazione proteica mediante metodo BCA

Le dishes contenenti le cellule sono state poste in una box di ghiaccio e una volta tolto il mezzo di coltura si procede con il lavaggio in PBS a freddo. Grazie ad uno scraper le cellule vengono staccate e poi raccolte in falcon corrispondenti alla condizione sperimentale (figura 19). Per ottenere il pellet si procede con la centrifugazione a 13000 rpm per 10 minuti a 4°C e successivamente viene eseguita l'estrazione proteica con RIPA buffer. I campioni ottenuti vengono vortexati e congelati a -80 °C.

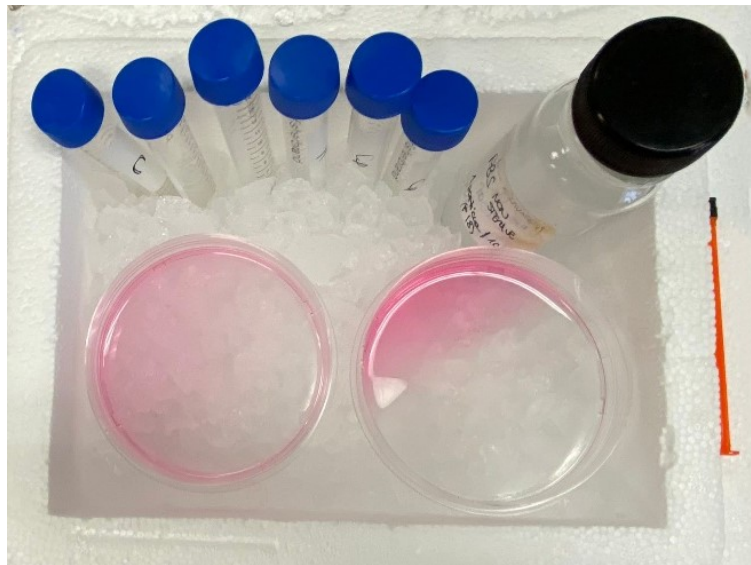


Figura 19: Raccolta delle cellule post- trattamento al fine di ottenere il pellet necessario alla quantificazione proteica.

A questo punto si procede con la quantificazione proteica con metodo BCA che 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 avviene in incubatore a 37°C per 30 minuti. Il colore viene misurato alla lunghezza d'onda di 562 nm ed è lineare con la concentrazione proteica.

Dato che la quantificazione delle proteine basata su BCA è significativamente influenzata dalla composizione della matrice del campione, per dimostrare l'impatto dell'interferenza della matrice del campione, è necessario preparare una curva standard con diluizione di albumina di siero bovino (BSA) (Wieland N. 2016).

3.3.2 Real time PCR

Per valutare l'espressione di alcuni geni coinvolti nel processo di stress ossidativo, apoptosi e nei cambiamenti epigenetici è stata utilizzata la real time PCR, una tecnica di analisi quantitativa che permette simultaneamente di amplificare e quantificare il DNA.

Nello specifico è stata valutata l'espressione di:

- **BAX** (*Apoptosis regulator*) : Gene che codifica per proteine pro-apoptotiche.
- **XIAP** (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*) : Proteina inibitrice dell'apoptosi.
- **CASPASI 3/ 7** (*Caspase 3/7*) : Enzimi responsabili dell'esecuzione del processo apoptotico.
- **SOD 1** (*superoxide dismutase 1*) : Enzima implicato nel processo apoptotico.
- **CAT** (*Catalase*): Enzima detossificante.
- **HDAC1-2- 3- 8** (*Histone deacetylase 1-2-3-8*) : Classe di enzimi che rimuovono i gruppi acetilici consentendo agli istoni di avvolgere più strettamente il DNA.
- **DNMT1- 3a** (*DNA methyltransferase 1- 3a*) : Enzimi che catalizzano la metilazione del DNA.

I pellet di cellule Caco-2 che era stato precedentemente congelato dopo il trattamento è stato omogenizzato in un tampone di lisi. Per l'estrazione dell'RNA totale è stato utilizzato il reagente RNazol che è una miscela di guanidina, tiocianato e fenolo in una soluzione monofasica in grado di dissolvere efficacemente DNA, RNA e proteine. L'aggiunta di acqua alla miscela consente, in questo caso, la precipitazione dell'RNA che viene poi isolato mediante precipitazione in alcol, lavaggio e solubilizzazione. Il metodo di isolamento dell'RNA basato su questo reagente viene eseguito a temperatura ambiente, senza l'uso di cloroformio per la separazione di fase, e consente l'uso in RT-qPCR senza richiedere il trattamento con DNasi.

Una volta terminata la fase di estrazione la quantificazione dell'RNA è stata determinata mediante spettrofotometria utilizzando un Nanophotometer™ P-Class (Implen). La trascrizione inversa è stata condotta da 1 µg di mRNA con kit di trascrizione inversa di cDNA ad alta capacità (biosistemi applicati) seguendo le linee guida del produttore. Il cDNA ottenuto con la retrotrascrizione (MyCycler Thermal Cycler System, Bio-Rad) è stato considerato come lo stock (1:1), questo stock è stato diluito con acqua miliQ (1:10) per ottenere le concentrazioni di lavoro. Tutti i cDNA sono stati mantenuti a -20°C.

Per le RT-qPCR, è stato utilizzato il metodo SYBR Green con un sistema di rilevamento multicolor Real-Time PCR (Bio-Rad) iQ5 con singole strisce trasparenti. Tutti i replicati sono stati eseguiti in duplicato. Per ciascuna reazione, la miscela conteneva: 1 μ L di cNDA (1:10) + 5 μ L di iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) + 3,8 μ L di acqua miliQ + 0,1 μ L di primer diretto + 0,1 μ L di primer inverso. (Forner-Piquer I. et al. 2020)

L'elenco dei primer utilizzati è stato riportato nella tabella 3

Il ciclo termico è stato il seguente: 95 °C per 3 min; 45 cicli di denaturazione (10 s a 95 °C) seguiti da 20 s per la fase di annealing a 60 °C per , CASP7, SOD1 e CAT; 58 °C per XIIAP, CASP3, HDAC1, HDAC2, DNMT1 e DNMT3a ; 56 °C per HDAC3 ; 54 °C per HDAC8 ; infine, 20 s per l'allungamento a 72 °C.

Tutti i campioni sono stati testati in triplicato con il gene di riferimento β -actina per la normalizzazione dei dati.

I risultati della RT-qPCR sono stati analizzati con i valori di Ct (soglia del ciclo) dei geni target e di riferimento con il metodo delta - delta Ct (Pfaffl M.W. 2001) utilizzando il foglio di calcolo fornito da Bio-Rad (Analisi dell'espressione genica per il sistema di rilevamento della PCR in tempo reale iCycler iQ versione 2.0).

Gene	Simbolo	Forward	Reverse
Apoptosis regulator	<i>BAX</i>	TCAGGATGCGTCCACCAAGAAG	TGTGTCCACGGCGGCAATCATC
X-linked inhibitor of apoptosis protein	<i>XIAP</i>	TGGCAGATTATGAAGCACGGATC	AGTTAGCCCTCCTCCACAGTGA
Caspase-3	<i>CASP3</i>	CTCTGGTTTTCGGTGGGTGT	CGCTCCATGTATGATCTTTGGTT
Caspase-7	<i>CASP7</i>	GTGGGAACGATGGCAGATGA	GAGGGACGGTACAAACGAGG
superoxide dismutase 1	<i>SOD1</i>	GGTCTCACTTTAATCCTCTATCCAG	CCAACATGCCTCTCTTCATCC
Catalase	<i>CAT</i>	TCCGGGATCTTTTTAACGCCATTG	TCGAGCACGGTAGGGACAGTTCAC
Histone deacetylase 1	<i>HDAC1</i>	AACCTGCCTATGCTGATGCT	CAGGCAATTCGTTTATCAGA
Histone deacetylase 2	<i>HDAC2</i>	GGGAATACTTTCTGGCACA	ACGGATTGTGTAGCCACCTC
Histone deacetylase 3	<i>HDAC3</i>	TGGCTTCTGCTATGTCAACG	GCACGTGGGTTGGTAGAAGT
Histone deacetylase 8	<i>HDAC8</i>	TTTTCCCAGGAACAGGTGA	AGCTCCCAGCTGTAAGACC
DNA methyltransferase 1	<i>DNMT1</i>	CTACCAGGAGAAGGACAGG	CTCACAGACGCCACATCG
DNA methyltransferase 3a	<i>DNMT3a</i>	TTGGGCATAAAGGTAGGAA	CATACTCCTGCTGCTGATC

Tabella 3: Elenco dei primer utilizzati per l'analisi RT-qPCR

3.3.3 Analisi dell'espressione proteica mediante Western blot

Il western blotting è una tecnica che viene utilizzata per l'identificazione di molecole proteiche specifiche presenti all'interno del campione in esame tramite l'utilizzo di anticorpi specifici. La miscela di proteine viene separata in condizioni denaturanti SDS-page (figura 20) in base alle loro dimensioni utilizzando un gel di poliacrilammide al 12%. Nei pozzetti del gel saranno caricati 3 μL di marker (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards BIORAD) e 25 μL di campione costituito da estratto proteico, sample buffer 2X e RIPA buffer. Si procede con la corsa elettroforetica a 75V per 45 minuti e poi 110V fino alla completa separazione delle bande che ci permetteranno di riconoscere le varie proteine in base al peso molecolare.

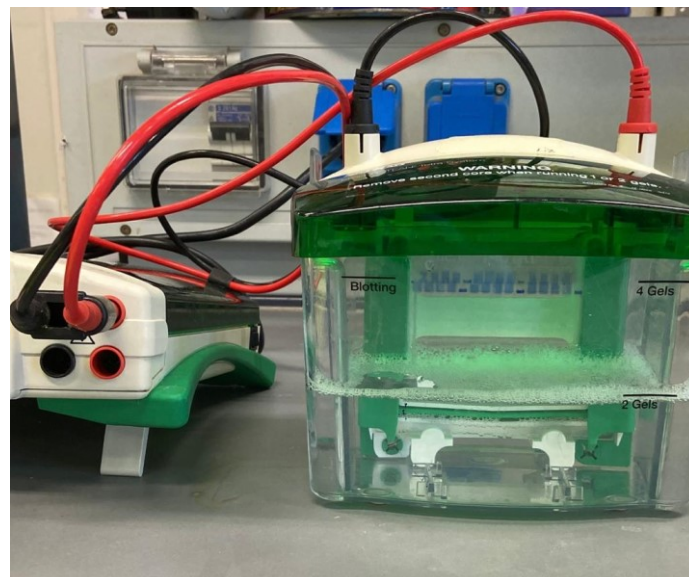


Figura 20: Separazione delle proteine tramite SDS- page

Terminata la corsa elettroforetica è stato effettuato il trasferimento delle proteine dal gel ad una membrana di PVDF attivata in metanolo al 100%.

Per il trasferimento viene preparato un “ sandwich” (figura 21) formato da spugnetta, carta da filtro Whatman, precedentemente imbevuti di tampone di trasferimento, gel, membrana di PVDF e di nuovo carta whatman e spugnetta.

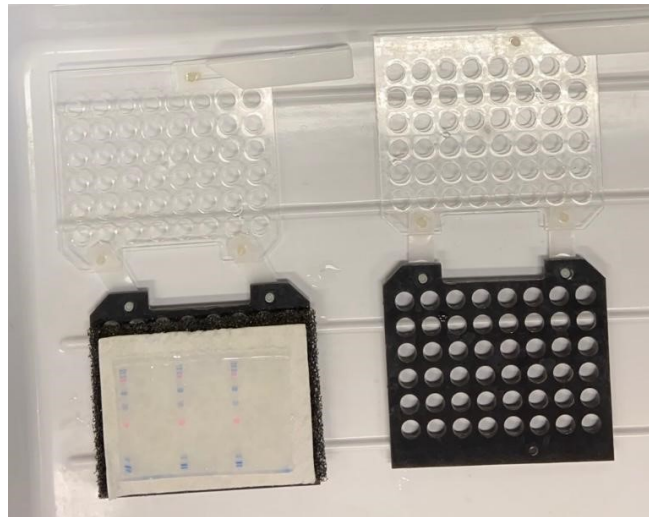


Figura 21: Preparazione del “ sandwich” necessario al trasferimento delle proteine sulla membrana di PVDF

Il tutto è tenuto insieme da supporti in plastica posti tra due elettrodi paralleli all'interno di una vaschetta per elettroforesi contenente il tampone di trasferimento, rivolgendo il lato relativo alla membrana di PVDF verso l'anodo. Il trasferimento delle proteine viene fatto a 30 V costanti overnight, a 4°C.

La membrana sul quale è avvenuto il trasferimento è stata poi immersa in una soluzione di blocking e successivamente lavata con TBS tween (Tris HCl 20 mM a pH 7,6, NaCl 140 Mm, Tween 20 allo 0,1%). A questo punto la membrana può essere incubata con l'anticorpo primario specifico per 1.30 h a temperatura ambiente al termine del quale verranno effettuati dei lavaggi in TBS- TWEEN20 1%. La membrana viene successivamente incubata per altri 1.30h con l'anticorpo anti-proteina specifico.

Al termine dell'incubazione sulla membrana è stata messa una soluzione Pierce™ ECL (Thermo fisher) che permette la rilevazione delle bande al Chemidoc grazie all'acquisizione del segnale chemiluminescente.

Per questo studio sono stati testati vari marker:

- **SOD**: l'enzima superossido dismutasi è un importante antiossidante presente in quasi tutte le cellule esposte all'ossigeno e favorisce la dissociazione dell'anione superossido in ossigeno molecolare e in perossido di idrogeno, mediante reazioni di ossido-riduzione.
- **CAT**: La catalasi è un enzima appartenente alla classe delle ossidoreduttasi coinvolto della detossificazione della cellula dalle specie reattive dell'ossigeno.

- **TRX**: La tioredoxina reduttasi è un enzima ossidoriduttivo importante nella difesa delle cellule contro l'azione dei radicali liberi ossidanti.
- **Caspasi 3**: E' un enzima proteolitico che svolge un ruolo chiave nell'apoptosi, è coinvolto anche in altri meccanismi come infiammazione e proliferazione cellulare. Ne esistono vari tipi e nello specifico la caspasi 3 è definita 'effettrice', è quindi responsabile di eventi come la frammentazione del DNA, compattazione cromatica ecc..
- **TNF α** : il fattore di necrosi tumorale è una citochina coinvolta nel processo di infiammazione, si occupa principalmente della regolazione delle cellule del sistema immunitario.
- **Istone H4 ac** : L'istone H4 è una delle cinque proteine istoniche principali che vanno a formare la struttura portante dei nucleosomi e la sua acetilazione incide sull'espressione genica del DNA che è avvolto intorno all'istone.
- **HDAC 2**: l'istone deacetilasi 2 appartiene alla classe degli enzimi istone deacetilasi responsabili della rimozione dei gruppi acetilici dai residui di lisina nella regione N-terminale degli istoni centrali. Per questo svolge un ruolo centrale nell'espressione genica facilitando la formazione di complessi repressori della trascrizione.

Statistica:

Sono stati eseguiti almeno tre replicati biologici per ogni esperimento, condotti in tre diverse sessioni sperimentali.

La significatività statistica è stata valutata con il test T di Student, dove ogni campione è stato paragonato al controllo negativo ed un valore P inferiore a 0.05 è stato considerato statisticamente significativo.

I dati sono stati rappresentati come media \pm deviazione standard.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Valutazione dell'effetto citotossico del Metilgliossale

Per la messa a punto del modello di stress glico-ossidativo nelle cellule Caco-2 è stata necessaria una fase di trattamenti preliminari che hanno permesso di individuare le condizioni sperimentali ottimali.

Il grafico della figura 22 riporta la valutazione nel tempo dell'effetto citotossico dell' MGO utilizzato a due diverse concentrazioni: 3 e 5 mM per diversi tempi.

Il grafico rappresenta la percentuale (%) di cellule vive (verde), apoptotiche (blu) e morte (rosso). Cellule Caco-2 sono state trattate in assenza o presenza dell'agente stressante e analisi sono state eseguite incubando le cellule per 2 e 4 ore. Si assiste ad una significativa diminuzione delle cellule vive in funzione del tempo e della concentrazione dell'agente ossidante; già dopo due ore con una concentrazione di MGO 3 mM si vede una diminuzione di circa il 20% delle cellule vive con un progressivo aumento delle cellule apoptotiche e morte.

Tale effetto è maggiore nelle cellule trattate per quattro ore dove le cellule morte, rispetto al controllo, aumentano di circa il 40% con MGO 3 mM e circa 60% con MGO 5 mM.

Considerato che le cellule trattate per 2 ore risultano avere un fenotipo prevalentemente apoptotico rispetto alle cellule trattate per 4 ore, in cui sono maggiormente presenti cellule morte e debris, abbiamo dedotto che l'effetto del metilgliosale sulla citotossicità possa avere una correlazione concentrazione e tempo dipendente.

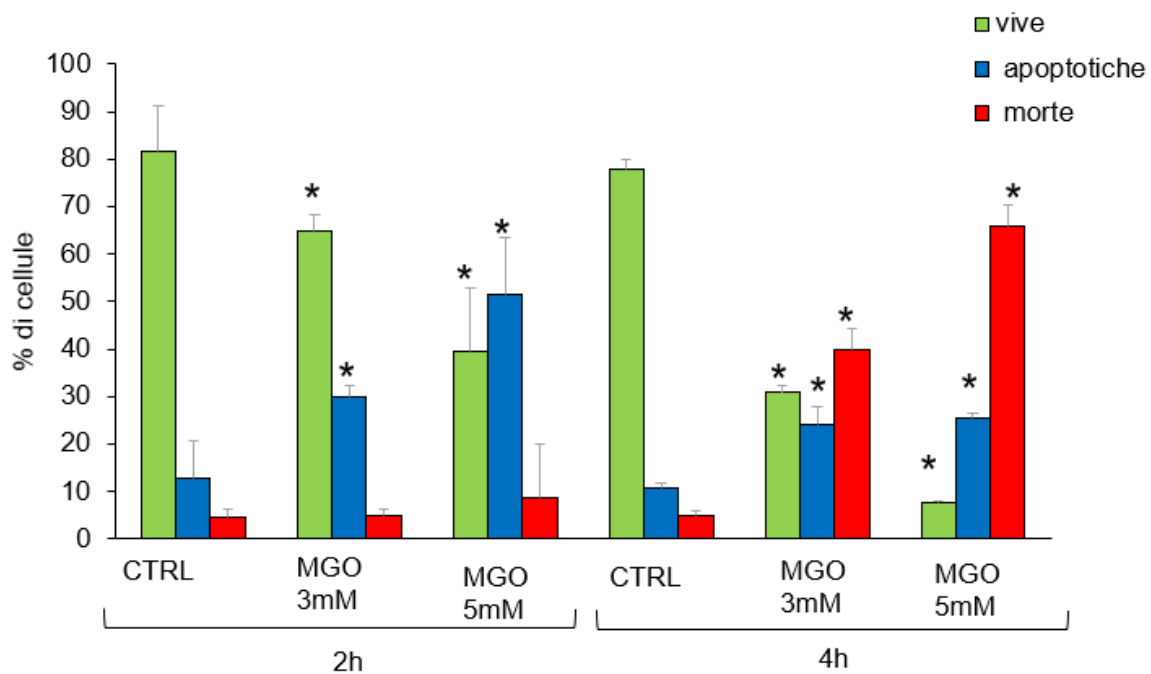


Figura 22: Valutazione nel tempo (2 e 4 ore) dell'effetto citotossico del metilgliosale (MGO) utilizzando diverse concentrazioni dell'agente stressante (3 mM e 5 mM). I dati sono rappresentati come percentuale (%) di cellule vive (in verde), apoptotiche (in blu) e morte (rosse). Le colonne indicano la media \pm SD. * $p < 0.05$ Vs il rispettivo CTRL (Student T-test)

4.2 Effetto del MGO sui livelli di ROS citosolici

Una volta confermato l'effetto citotossico dell'MGO sulle cellule Caco-2, è risultato interessante indagare i meccanismi, a livello ossidativo, che potrebbero essere coinvolti analizzando la presenza di radicali a livello citoplasmatico e mitocondriale.

Per valutare l'aumento della produzione di ROS intracellulare citosolici è stata utilizzata la sonda DCDFDA.

Nel grafico della figura 23 sono mostrati i risultati ottenuti, espressi come percentuale (%) di cellule ad alto contenuto di ROS, dopo il trattamento a 2 e 4 ore in presenza e in assenza dell'agente stressante.

Dal grafico si osserva un aumento significativo di ROS dipendente dalla concentrazione nel trattamento a 2 ore; infatti, alla concentrazione di 3 mM si ha un aumento della produzione di ROS di 2 volte rispetto al controllo mentre la concentrazione 5 mM a 2 ore è correlata ad un aumento della produzione di ROS di quattro volte. Questo aumento concentrazione dipendente però non lo ritroviamo nelle cellule trattate con MGO per 4ore. Questo probabilmente è dovuto al fatto che in queste condizioni si riscontra una morte cellulare molto elevata e la sonda non è in grado di penetrare nella cellula dandoci così un dato realistico della produzione di ROS.

Sulla base di questi esperimenti preliminari è stato concluso che le condizioni sperimentali ottimali per il modello prevedevano un trattamento a 2h con MGO ad una concentrazione di 3 mM.

Utilizzando queste condizioni sperimentale, la formazione di ROS intracellulare è stata analizzata anche mediante un'analisi di microscopia in fluorescenza che ci ha permesso di osservare come l'emissione di fluorescenza sia collegata ad un aumento della produzione di ROS. Come mostrato nella figura 24c una maggiore fluorescenza è osservabile nelle cellule incubate con MGO rispetto alle cellule di controllo. Questo indica che probabilmente l'effetto citotossico del metilgliossale è mediato dalla formazione di ROS.

Dal grafico 24b invece si osserva la diversa distribuzione citometrica delle cellule e quindi lo shift della curva verso la zona 'High' ROS indice di un maggior accumulo di anioni superossido dopo il trattamento.

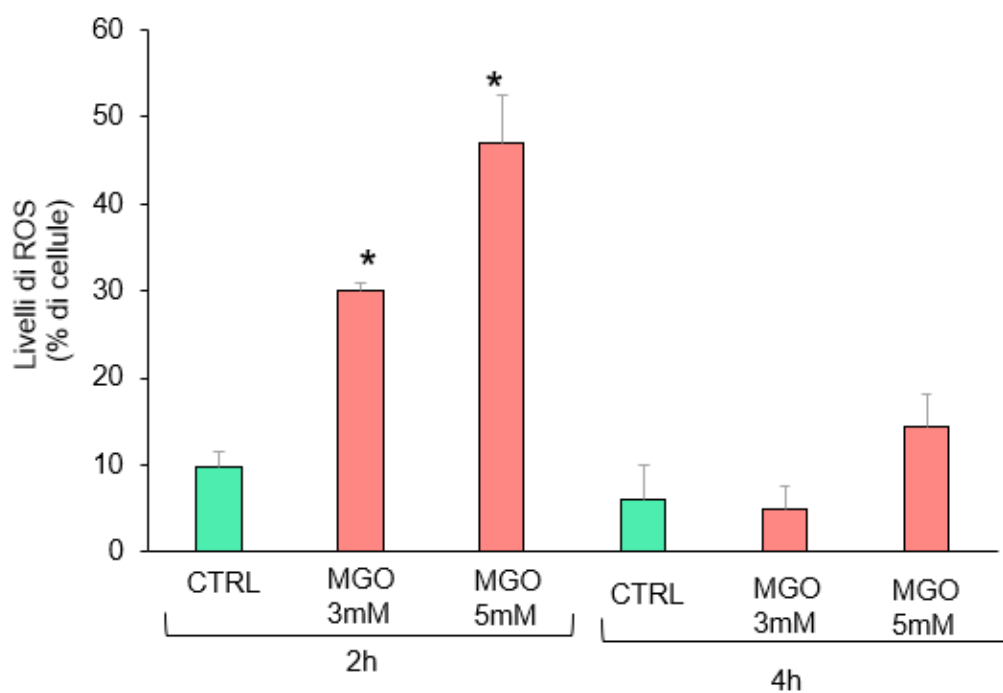


Figura 23: Valutazione nel tempo (2 e 4 ore) della produzione intracellulare di ROS utilizzando diverse concentrazioni di MGO (3 mM e 5 mM). Il livello dei radicali è riportato come percentuale di cellule ad alto contenuto di ROS. I risultati sono espressi come media \pm SD. * $p < 0.05$ Vs il rispettivo CTRL (Student T-test)

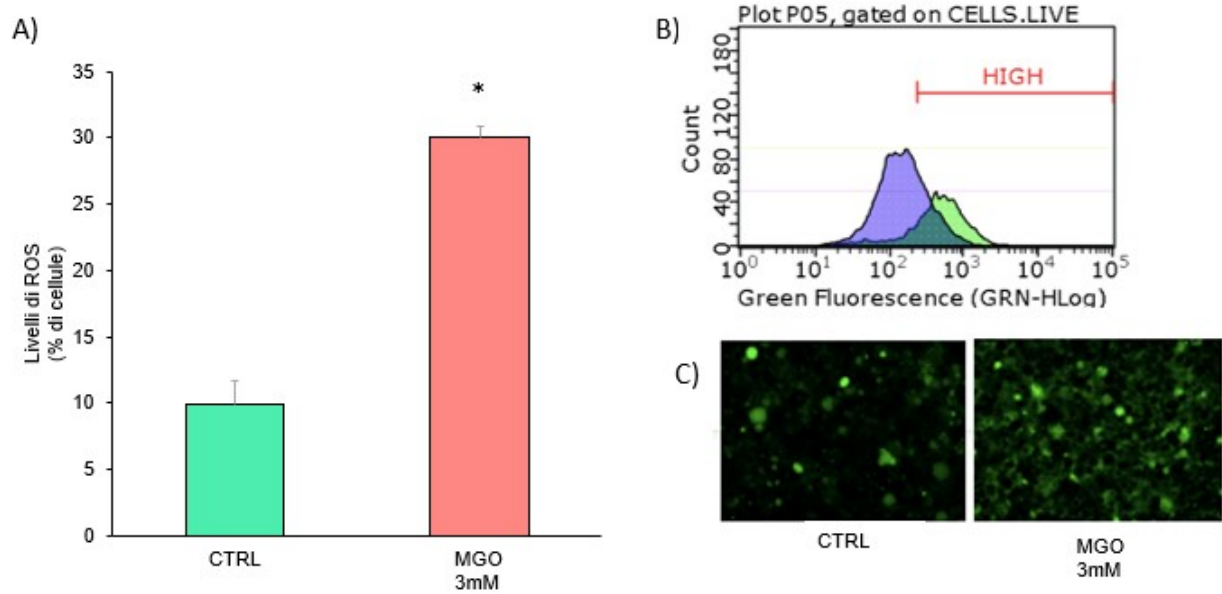


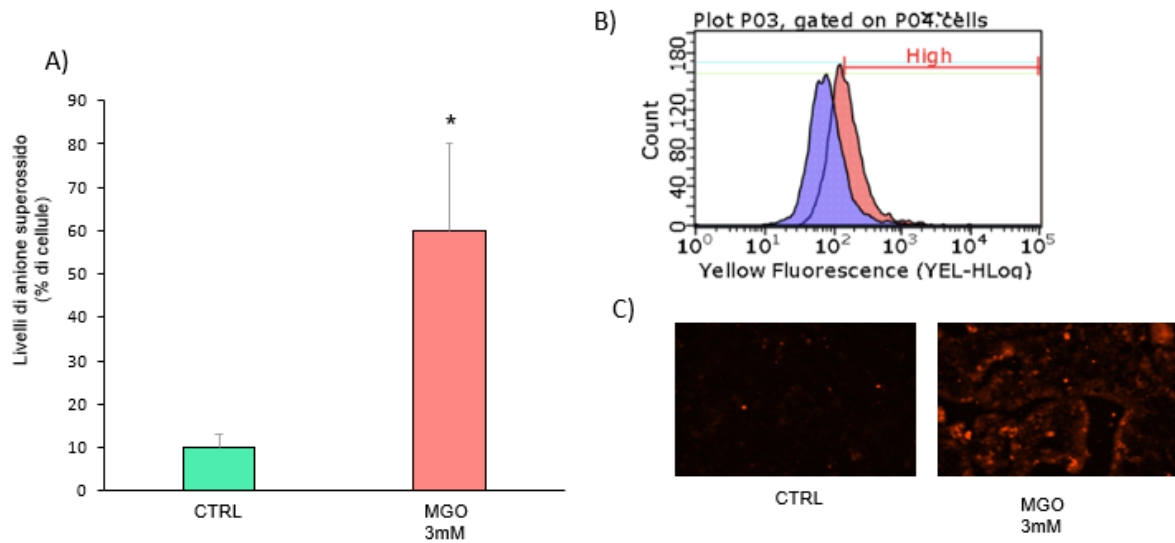
Figura 24: Valutazione della produzione radicalica in cellule Caco2 trattate con la miglior condizione sperimentale rappresentata dall'incubazione di 2 ore di MGO 3 mM. I risultati sono stati ottenuti mediante l'utilizzo della sonda fluorescente diclorofluoresceina (DCDFA). I dati sono espressi come A) percentuale (%) di cellule ad alto contenuto di ROS B) Plot della distribuzione citometrica a flusso di cellule ad alto contenuto di ROS, C) Imaging mediante Lionhearth Automated Microscope. Le colonne rappresentano la media \pm SD. * $p < 0.05$ Vs CTRL (Student T-test)

4.3 Effetto del MGO sui livelli di ROS MITOCONDRIALI

Il mitocondrio è il principale produttore di ROS e una loro eccessiva produzione può danneggiare questo organello con conseguente alterazione dell'equilibrio ossidativo di tutta la cellula. Pertanto, è stato necessario indagare ulteriormente questo aspetto andando a valutare la produzione di ROS a livello mitocondriale utilizzando la sonda MitoSOX.

Come è possibile osservare nella figura 25a c'è un aumento significativo di circa il 70% rispetto al controllo, dei ROS mitocondriali nelle cellule incubate per 2 ore con MGO 3mM. A conferma di ciò le foto ottenute da Lionhearth (figura 24c) evidenziano chiaramente una maggiore fluorescenza nelle cellule trattate con l'agente stressante proprio perché c'è una correlazione diretta tra l'emissione di fluorescenza della sonda e aumento di ROS mitocondriali.

Il grafico 25b mostra lo shift della curva di distribuzione citometrica verso una popolazione 'High ROS' in seguito al trattamento per 2 ore con MGO 3mM



*Figura 25: Produzione dell'anione superossido mitocondriale in cellule Caco2 trattate per 2 ore in assenza o presenza di MGO 3 mM. I risultati sono stati ottenuti mediante la sonda fluorescente MitoSOX. I dati sono espressi come A) percentuale (%) di cellule ad alto contenuto di anione superossido B) Plot della distribuzione citometrica a flusso di cellule ad alto contenuto di anioni superossido C) Imaging mediante Lionheart Automated Microscope. Le colonne rappresentano la media \pm SD . * $p < 0.05$ Vs CTRL (Student T-test)*

4.4 Meccanismi molecolari: stress ossidativo

Poiché dai dati ottenuti in citofluorimetria è emerso che il metilgliossale induce un effetto citotossico nelle cellule, si sono voluti indagare gli eventuali meccanismi molecolari alla base dello stress ossidativo.

A tal proposito, mediante Real time PCR, è stata valutata l'espressione di due enzimi noti per la loro attività antiossidante: SOD1 e CATALASI.

In particolare, nella figura 26a è visibile un aumento significativo di espressione della SOD1 nelle cellule trattate per 2h con MGO 3mM.

Per quanto riguarda la CATALASI invece risulta esserci la tendenza ad una maggiore espressione ma il dato non è statisticamente significativo (figura 26b). Questa maggiore espressione di enzimi antiossidanti nelle cellule trattate con MGO dimostra che la cellula in condizioni di stress ossidativo mette in atto un meccanismo di difesa, soprattutto della SOD1 in grado di neutralizzare la formazione di superossido a livello mitocondriale.

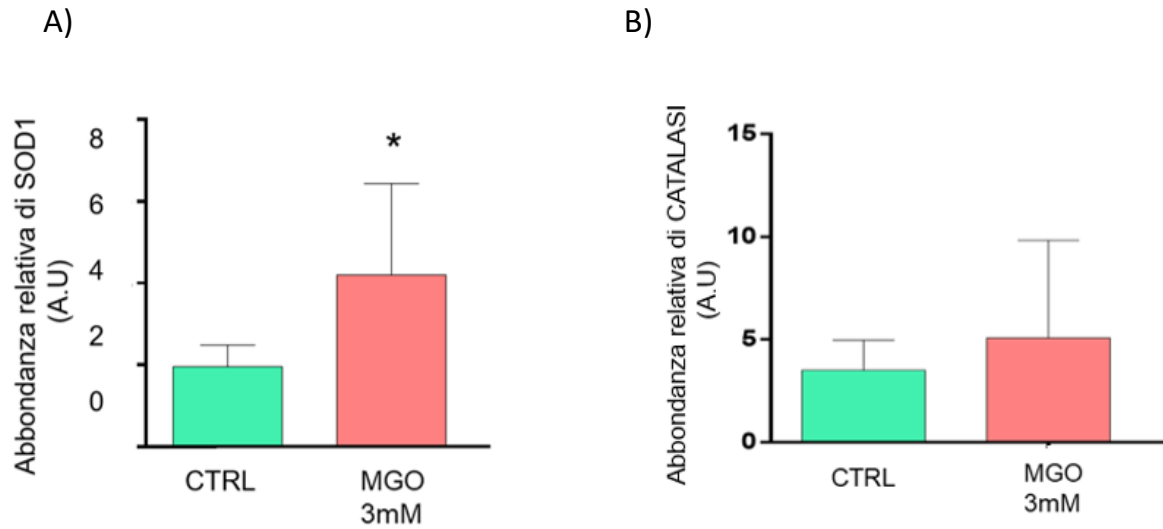


Figura 26: Livelli di mRNA dei principali biomarcatori dello stress ossidativo quali SOD1 e CATALASI in cellule Caco-2 trattate per 2 ore in presenza e in assenza di 3mM MGO. I dati sono stati normalizzati contro RPLP e Actina in entrambi i gruppi sperimentali. I dati sono mostrati come unità arbitrarie dell'abbondanza relativa all'espressione dello specifico gene. Le colonne rappresentano la media $\pm SD$.
* $p < 0.05$ Vs CTRL (Student T-test)

A supporto dei risultati ottenuti con la Real time PCR è stata eseguita un'analisi western blot di alcuni enzimi coinvolti del processo di stress ossidativo grazie al quale si è potuto confermare l'aumento significativo dell'espressione proteica della SOD1 nelle cellule trattate con MGO 3mM (figura 27a). Dall'analisi densitometrica è emerso che le cellule trattate con MGO mostrano livelli di espressione significativa ($*p < 0.05$) raddoppiati rispetto alla condizione di controllo ($2 \pm 0,5$ a.u). Nel caso della tioredoxina riduttasi il trattamento è in grado di promuovere l'espressione ($1,3 \pm 0,5$ a.u) rispetto alle cellule di controllo. Per l'enzima Catalasi invece non è stata osservata nessuna modifica rispetto al controllo.

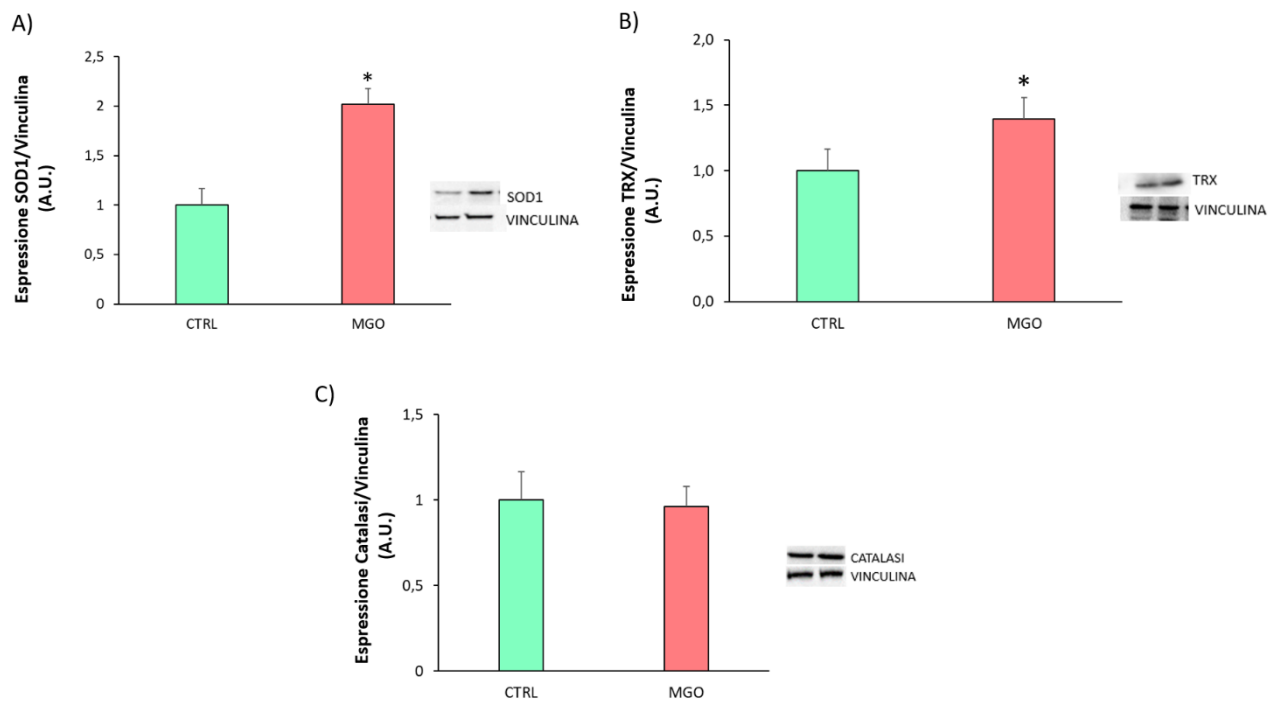


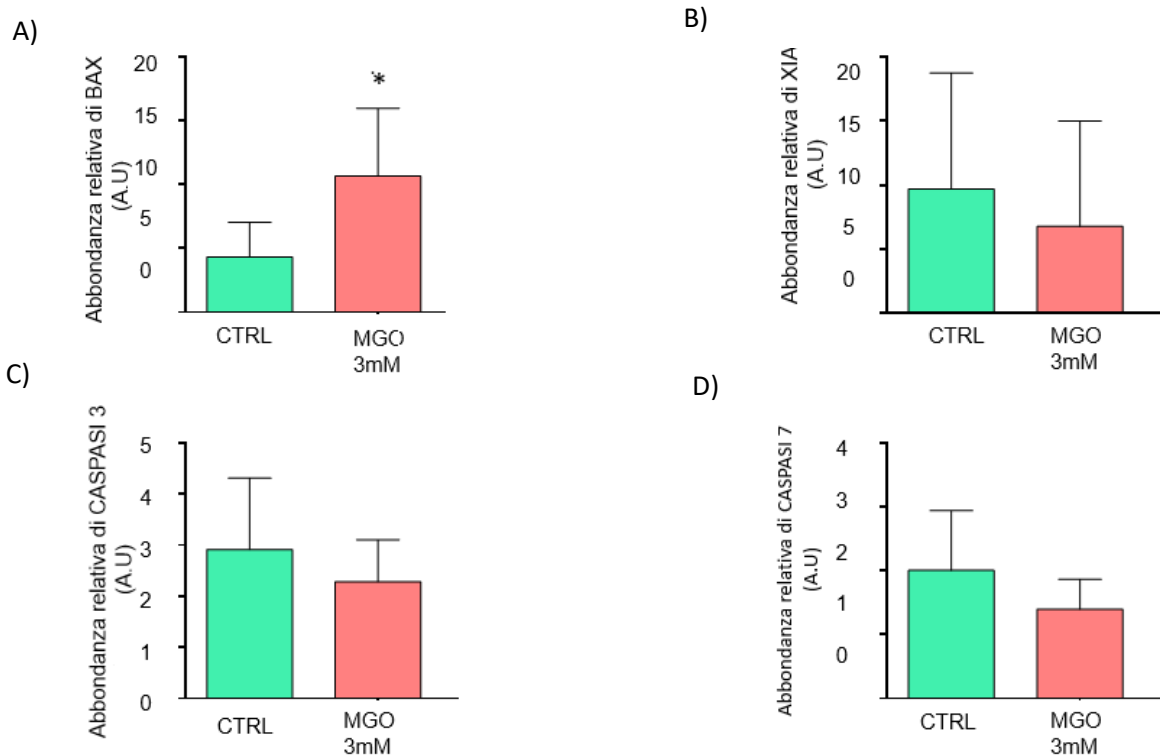
Figura 27: Espressione dei principali enzimi coinvolti nella risposta allo stress ossidativo. Cellule Caco2 sono state trattate per 3 ore in presenza o assenza di MGO 3 mM. E' stata analizzata l'espressione dell'enzima Catalasi, Superossido dismutasi 1 (SOD) e Tiorredoxina riduttasi (TRX). I dati sono normalizzati verso la rispettiva Vinculina ed espressi come $media \pm SD$, $n = 3$. * $p < 0.05$ Vs CTRL (Student T-test)

4.5 Meccanismi molecolari: apoptosi

Dal momento che i dati in citofluorimetria suggeriscono un coinvolgimento dei processi apoptotici, per valutare ancora più in dettaglio i meccanismi molecolari che sono alla base dell'azione citotossica del metilgliossale sono stati analizzati alcuni marker apoptotici specifici mediante Real time PCR.

Dai risultati riportati nella figura 28a si evince un significativo aumento di BAX nelle cellule trattate con MGO.

A tal proposito è stato ipotizzato che il trattamento con metilgliossale, causando un aumento di ROS a livello cellulare, determini un aumento del regolatore apoptotico BAX. Quest'ultimo agendo a livello mitocondriale, innesca una serie di processi che portano ad un aumento della CASPASI 3 essenziale per l'avvio del processo apoptotico. Dai risultati ottenuti in Real time PCR però questo aumento non è stato evidenziato (figura 28c). Sono stati analizzati altri due biomarcatori dell'apoptosi CASPASI 7 e XIAP ma non abbiamo ottenuto dati statisticamente significativi. (figura 28b,d)

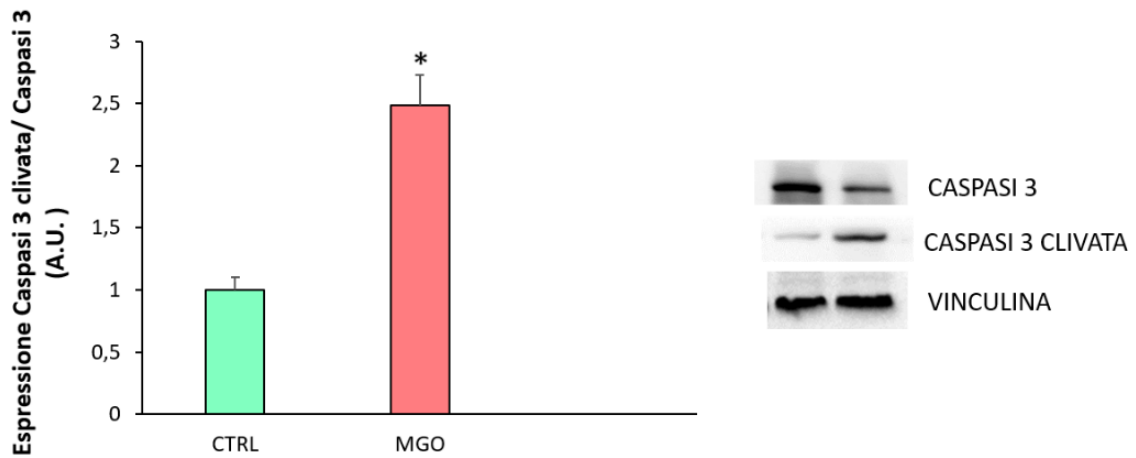


*Figura 28: Livelli di mRNA dei principali biomarcatori dell'apoptosi quali BAX, XIAP, Caspasi 3 e Caspasi7 in cellule Caco-2 trattate per 2 ore in presenza e in assenza di 3mM MGO. I dati sono stati normalizzati contro RPLP e Actina in entrambi i gruppi sperimentali. I risultati sono mostrati come unità arbitrarie dell'abbondanza relativa all'espressione dello specifico gene. Le colonne rappresentano la media \pm SD. * $p < 0.05$ Vs CTRL (Student T-test)*

A questo punto oltre a valutarne l'espressione genica della CASPASI 3 si è voluto indagare sulla sua effettiva attivazione tramite western blot (figura 29).

Le caspasi sono sintetizzate come proenzimi inattivi che vengono attivati mediante un processo proteolico dando origine a due frammenti di 17 kDa and 12 kDa. Pertanto, abbiamo investigato anche i livelli di caspasi-3 attivata (cleaved -caspasi-3) valutando i livelli del frammento maggiore (17-19 kDa).

Nei dati ottenuti mediante western blot non si evidenziano modificazioni nei livelli di caspasi-3 nelle cellule trattate per 2h con MGO 3mM, confermando i dati relativi ai livelli di mRNA. Tuttavia, come mostrato nella figura 29, nelle cellule trattate con MGO, si osserva un aumento significativo di circa 2 volte dei livelli della cleaved-caspasi3 rispetto al controllo ($2,48 \pm 0,5$ a.u). Questi dati suggeriscono che a seguito del trattamento con MGO vi sia l'attivazione della caspasi -3 con conseguente stimolazione dei processi pro-apoptotici.

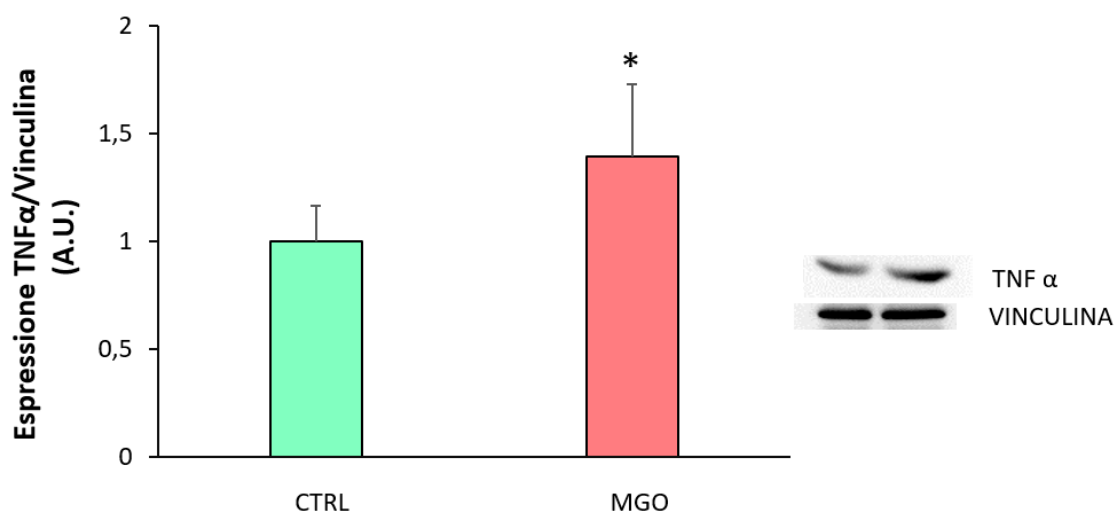


*FIGURA 29: Espressione della proteina pro-apoptotica Caspasi 3. Cellule Caco2 sono state trattate per 2 ore in presenza o assenza di MGO 3 mM. I risultati sono espressi come unità arbitrarie del rapporto tra la forma attiva della proteina (Caspasi 3 clivata) e il rispettivo basale (Caspasi 3). I dati sono normalizzati verso la Vinculina ed espressi come media \pm SD, n = 3. * p <0.05 Vs CTRL (Student T-test)*

4.6 Meccanismi molecolari: infiammazione

A supporto dei dati ottenuti si è voluto indagare se il metilgliossale potesse indurre un aumento dell'infiammazione cellulare. Per far ciò attraverso l'analisi western blot si è indagato l'effetto del trattamento con MGO sui livelli di TNF α . Nel grafico rappresentato nella figura 30 si evince un aumento dei livelli di TNF α ($1,4 \pm 0,5$ a.u) nelle cellule trattate con MGO.

E' possibile ipotizzare che l'MGO stimola la sintesi di TNF α determinando uno stato infiammatorio a livello cellulare che può alimentare i processi ossidativi e apoptotici. Il TNF α , infatti, può determinare la formazione di ROS intracellulari che attivano una serie di meccanismi che inducono a loro volta il processo apoptotico e un aumento di citochine pro-infiammatorie come il TNF α che agirà autoalimentando i meccanismi che sollecitano la cellula a produrre ROS.



*Figura 30: Espressione della citochina proinfiammatoria TNF α . Cellule Caco2 sono state trattate per 3 ore in presenza o assenza di MGO 3 mM. I dati sono normalizzati verso la Vinculina ed espressi come media \pm SD, n = 3. * $p < 0.05$ Vs CTRL (Student T-test)*

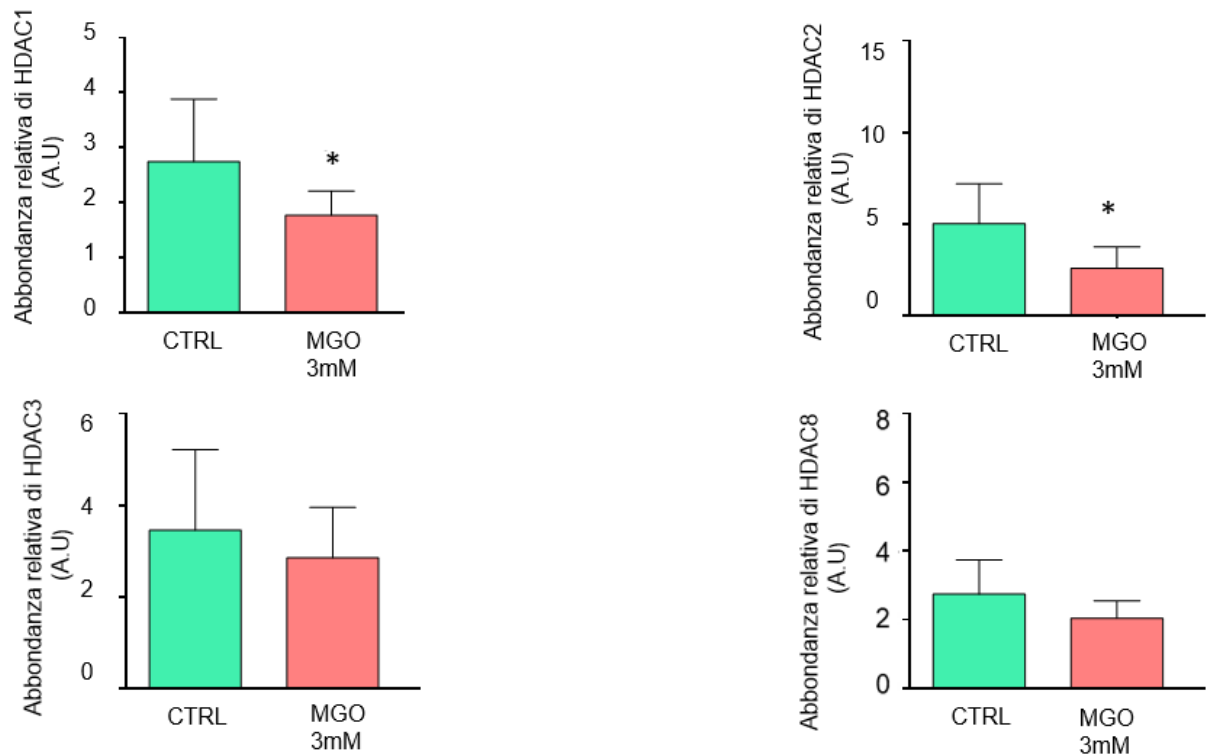
4.7 Modifiche epigenetiche indotte da MGO

Dai dati ottenuti è emerso che il trattamento con metilgliossale in cellule Caco-2 è in grado di modulare dell'espressione di proteine implicate in processi ossidativi, apoptotici e infiammatori. Pertanto, abbiamo voluto investigare se tale modulazione potesse coinvolgere meccanismi epigenetici.

A tale scopo abbiamo indagare l'espressione di alcune deacetilasi in quanto risultano essere i principali biomarcatori epigenetici dell'acetilazione.

I grafici riportati nella figura 31 indicano una significativa riduzione delle HDAC1 e HDAC2 nelle cellule dopo il trattamento con MGO.

Queste deacetilasi svolgono un ruolo chiave nella regolazione dell'espressione genica essendo responsabili del rimodellamento della cromatina, nello specifico la deacetilazione degli istoni porta a una struttura della cromatina condensata. Per questo motivo una riduzione dei livelli di HDAC1 e 2 sono indice di una maggiore acetilazione degli istoni, il DNA quindi risulta più accessibile ai fattori di trascrizione.



*Figura 31: Livelli di mRNA dei principali biomarcatori epigenetici dell'acetilazione quali HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8. I dati sono stati normalizzati contro RPLP e Actina in entrambi i gruppi sperimentali. I dati sono mostrati come unità arbitrarie dell'abbondanza relativa all'espressione dello specifico gene. Le colonne rappresentano la media \pm SD. * $p < 0.05$ Vs CTRL (Student T-test)*

Un altro aspetto che si è voluto considerare riguarda la metilazione del DNA. Attraverso la Real time PCR è stata valutata l'espressione di due marcatori epigenetici della metilazione: DNMT1 e DNMT3a. Seppur i dati non sono statisticamente significativi, nelle cellule dopo il trattamento con MGO, si osserva una riduzione di queste DNAmetiltrasferasi. Questi dati, in linea con i risultati precedenti, confermano che il MGO riduce il grado di metilazione a livello del promotore, favorendo la trascrizione genica. (Figura 32)

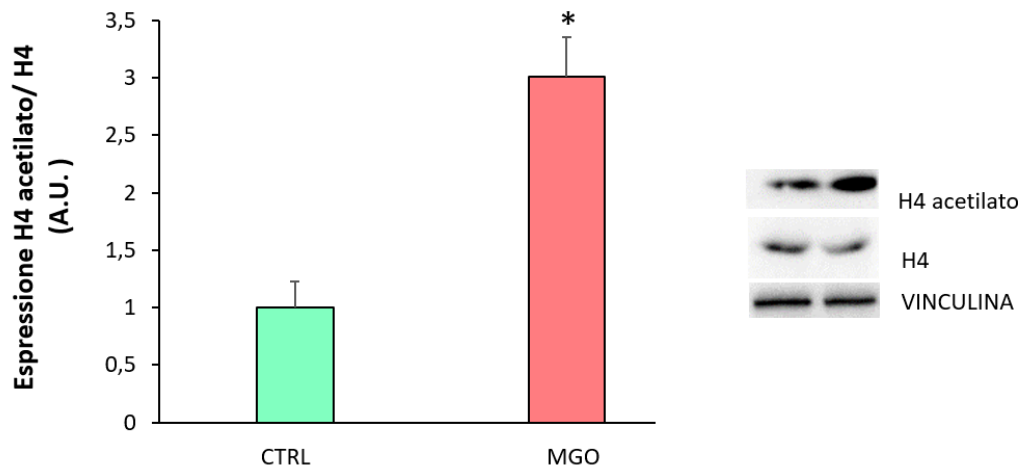


Figura 32: Livelli di mRNA dei principali biomarcatori epigenetici della metilazione quali DNMT1 e DNMT3a in cellule Caco-2 trattate per 2 ore in presenza e in assenza di 3mM MGO. I dati sono stati normalizzati contro RPLP e Actina in entrambi i gruppi sperimentali. I dati sono mostrati come unità arbitrarie dell'abbondanza relativa all'espressione dello specifico gene. Le barre rappresentano la media \pm SD.

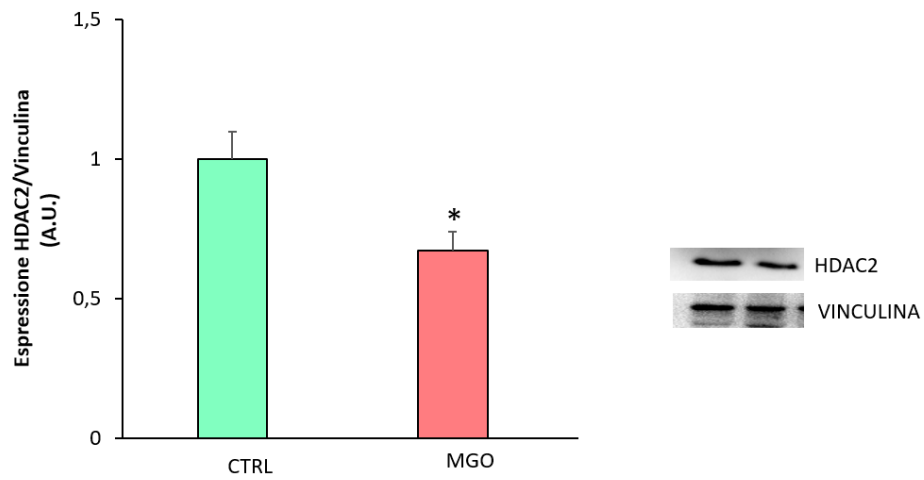
Per avvalorare i dati ottenuti in real time PCR, è stata fatta un'analisi western blot dell'istone H4 (figura 33), proteina che subisce modificazioni covalenti come acetilazione e metilazione che incidono sull'espressione genica del DNA. L'analisi densitometrica mostra un significativo aumento dell'acetilazione dell'istone H4 ($3 \pm 0,5$ a.u) nelle cellule trattate con MGO rispetto al controllo, il che indica un possibile aumento nella trascrizione di alcuni geni che possono essere coinvolti in processi apoptotici o infiammatori.

Inoltre, un altro dato significativo che è stato ottenuto per i cambiamenti epigenetici mediati da MGO, riguarda l' HDAC2 (figura 34). Con l'analisi western blot è stata osservata una ridotta espressione ($0,67 \pm 0,5$ a.u) di questo enzima nelle cellule trattate con MGO rispetto al controllo.

Dato che il ruolo chiave di queste deacetilasi è quello di rendere più difficile l'accesso dei fattori di trascrizione al DNA, portando quindi ad un silenziamento genico, la sua riduzione è concorde con i risultati ottenuti precedentemente sull'acetilazione (figura 33).



*Figura 33: Acetilazione della proteina Istonica 4. Cellule Caco2 sono state trattate per 3 ore in presenza o assenza di MGO 3 mM. I risultati sono espressi come unità arbitrarie del rapporto tra la forma acetilata dell'istone 4 (H4 acetilato) e la sua forma basale (H4). I dati sono la media \pm SD, n = 3. * $p < 0.05$ Vs CTRL (Student T-test)*



*Figura 34: Espressione dell'enzima dell' Istone Deacetilasi 2 (HDAC2) . Cellule Caco2 sono state trattate per 3 ore in presenza o assenza di MGO 3 mM. I dati sono normalizzati verso la Vinculina ed espressi come media \pm SD, n = 3. *p<0.05 Vs CTRL (Student T-test)*

4.8 Valutazione dell'effetto protettivo dei polifenoli sullo stress glicossidativo indotto da MGO

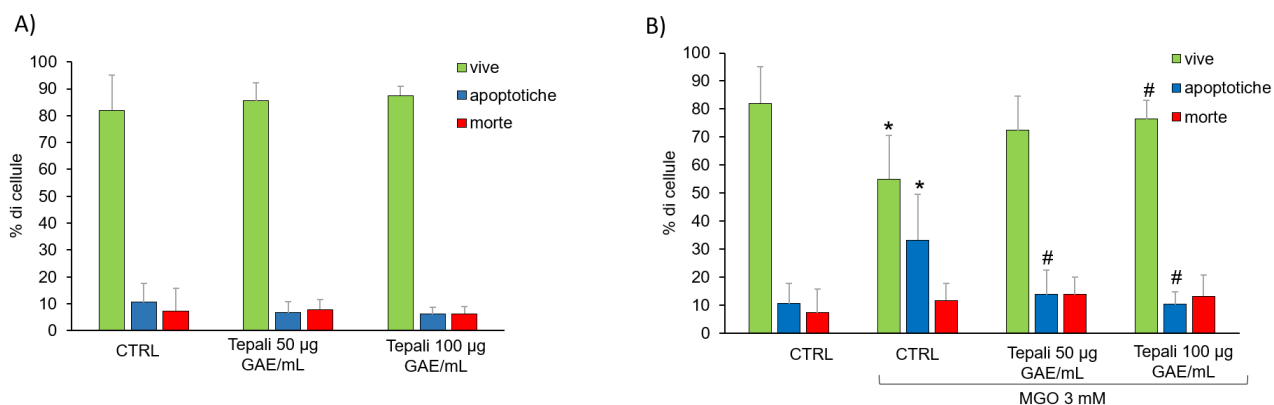
La messa a punto di questo modello potrebbe rappresentare un punto di partenza per capire se molecole di natura antiossidante possano interferire con i meccanismi che causano l'accumulo di ROS intracellulare. Per questo studio sono stati utilizzati i polifenoli estratti dai tepali di *Crocus sativus*.

Per la valutazione dell'effetto protettivo dei polifenoli estratti dai tepali, nei confronti del danno citotossico indotto da MGO, le cellule Caco-2 sono state trattate con due concentrazioni crescenti di polifenoli (50 e 100 µg GAE/mL) per 2h in assenza e in presenza di MGO 3 mM (Figura 35). L'analisi è stata effettuata al citofluorimetro e grazie all'utilizzo della sonda Viacount è stato possibile fare una distinzione tra la percentuale di cellule vive (verde), apoptotiche (blu) e morte (rosse).

Il trattamento con i polifenoli in assenza di MGO, non induce modifiche significative nella vitalità cellule, confermando la non citotossicità dell'estratto polifenolico.

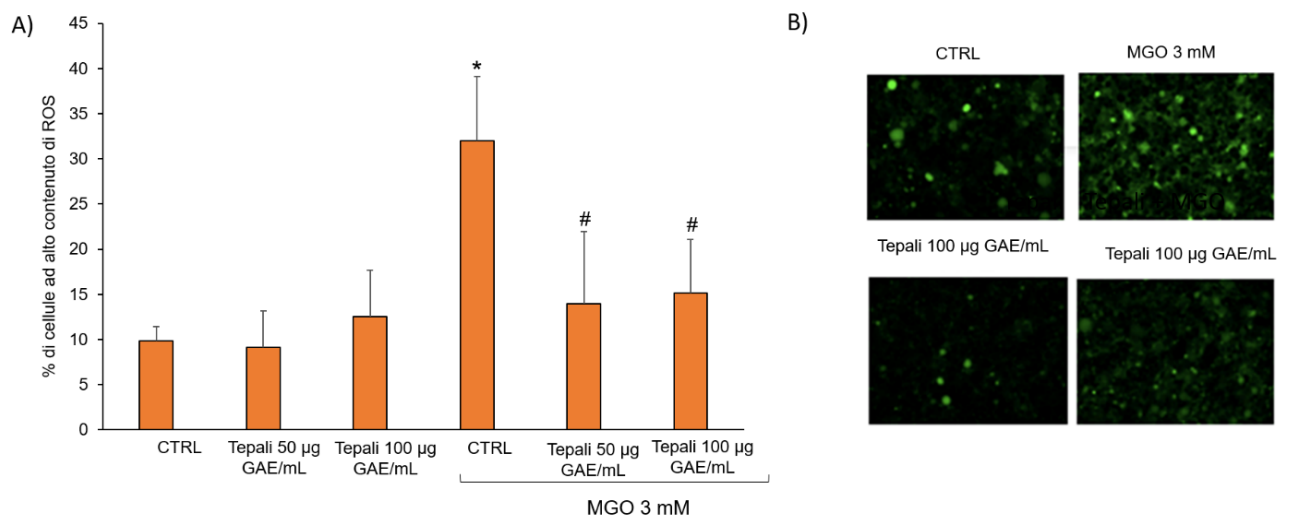
Come mostrato nel grafico 35b, si osserva una riduzione delle cellule apoptotiche in seguito al trattamento con MGO in presenza di polifenoli. Nello specifico le cellule trattate con MGO in presenza di 50 µg GAE/mL di

polifenoli mostrano una riduzione di circa il 30 % di cellule apoptotiche rispetto al controllo, invece nelle cellule trattate con 100 µg GAE/mL si arriva ad una riduzione di circa il 40%. Questi dati confermano che i composti polifenolici mostrano un effetto protettivo nei confronti della citotossicità indotta dal metilgliossale .



*Figura 35: Effetto protettivo dei tepali del *Crocus sativus* verso il danno citotossico indotto da MGO in cellule Caco-2. Le cellule sono state trattate in presenza di crescenti concentrazioni di tepali (50 e 100 µg GAE/mL) per 2 ore in assenza (A) e presenza di 3mM MGO (B). Lo studio è stato effettuato in citofluorimetrica mediante la sonda Viacount e dati sono rappresentati come percentuale (%) di cellule vive (in verde), apoptotiche (in blu) e morte (rosse). Le colonne esprimono la media \pm SD. * $p < 0.05$ Vs CTRL; # $p < 0.05$ Vs CTRL + MGO 3 mM (Student T-test)*

Inoltre è stato indagato l'effetto del trattamento con i polifenoli sulla formazione di ROS citosolici indotta da MGO. Le cellule sono state trattate in presenza di concentrazioni crescenti di tepali, per due ore in assenza e in presenza di MGO. Nessuna modifica dei livelli di ROS si osservano nelle cellule trattate con i polifenoli in assenza di MGO. Al contrario, i risultati ottenuti in citofluorimetria mostrano una significativa diminuzione (circa 50 %) delle cellule ad alto contenuto di ROS dopo il trattamento con 50 e 100 µg GAE/mL (figura 36a). Questo risultato è confermato dai dati di Imaging (figura 36b) dove si osserva una chiara riduzione della fluorescenza nelle cellule incubate per due ore in presenza e in assenza di MGO e con 100 µg GAE/mL.



*Figura 36: Valutazione dell'effetto protettivo dei tepali del Crocus sativus verso il danno ossidativo indotto da MGO. Le cellule sono state trattate in presenza di crescenti concentrazioni di tepali (50 e 100 µg GAE/mL) per 2 ore in assenza e presenza di 3mM MGO (A). Lo studio è stato effettuato in citofluorimetria mediante la sonda fluorescente diclorofluoresceina (DCDFA). i dati sono rappresentati come percentuale di cellule ad alto contenuto di ROS. I risultati sono espressi come media ±SD. * $p < 0.05$ Vs CTRL; # $p < 0.05$ Vs CTRL +MGO 3 mM (Student T-test) B) Imaging mediante Lionheart Automated Microscope di cellule incubate per 2 ore con i tepali (100 µg GAE/mL) in assenza e in presenza di 3mM MGO*

5. CONCLUSIONI

Lo scopo di questo lavoro di tesi è stato mettere appunto un modello di stress-glicossidativo nelle intestinali per valutare l'effetto protettivo dei fitocomposti. A tale scopo è stata scelta la linea cellulare Caco-2. Infatti, sebbene siano cellule tumorali, sono considerate un valido modello di cellule intestinali; esse subiscono un processo di differenziazione spontanea che porta alla formazione di un monostrato cellulare con caratteristiche morfologiche e funzionali simili agli enterociti maturi umani (Sambuy Y. et al . 2005). In questo studio per indurre lo stress glico- ossidativo è stato utilizzato il metilgliossale, un composto carbonilico altamente reattivo che può avere varie origini: viene prodotto nella fase intermedia della reazione di Maillard, dal metabolismo di alcuni batteri intestinali oppure può derivare da processi di lavorazione e stoccaggio di alimenti particolarmente ricchi di zuccheri.

La fase preliminare del lavoro di tesi ha permesso la selezione delle condizioni sperimentali (tempo e concentrazione di MGO) migliori per la messa a punto del modello: incubazione delle cellule per 2ore con MGO 3mM. In queste condizioni sperimentali, i risultati ottenuti mediante citofluorimetria hanno evidenziato che MGO induceva un significativo effetto citotossico e apoptosi cellulare, associato a un aumento dello stress ossidativo sia a livello cellulare che a livello mitocondriale.

Questi effetti sono in parte associati all'attivazione mediata da MGO di RAGE con conseguente innesco di pathways proinfiammatori e pro-apoptitici. Per confermare questa ipotesi abbiamo investigato i meccanismi molecolari alla base dell'azione citotossica indotta da MGO.

Dalle analisi fatte mediante RT-PCR e western blot è emerso un significativo aumento dell'espressione di questi enzimi noti per la loro attività antiossidante come SOD1 e TRX; questi dati suggeriscono che la cellula dopo aver subito uno stress metta in atto meccanismi che portano all'aumento delle proprie difese antiossidanti per contrastare la produzione di ROS.

Inoltre, i dati hanno evidenziato che MGO è in grado di modulare dell'espressione di alcuni biomarcatori dell'apoptosi: BAX, XIAP, CASPASI 3-7. In particolare, si è osservato un significativo aumento dell'espressione di BAX nelle cellule trattate con MGO. Questa proteina essendo un importante regolatore apoptotico innesca una serie di processi che portano all'attivazione della Caspasi 3. Le caspasi sono sintetizzate come proenzimi inattivi che vengono attivati mediante un processo proteolitico dando origine a due frammenti di 17 kDa and 12 Kda. I dati di western blot hanno dimostrato un aumento significativo dei livelli della caspasi-3 cleaved nelle cellule trattate con MGO.

Questi dati suggeriscono che a seguito del trattamento con MGO vi sia l'attivazione della caspasi -3 con conseguente stimolazione dei processi pro-apoptotici.

I risultati hanno evidenziato anche un aumento dei livelli di TNF α , una citochina coinvolta nell'infiammazione sistemica. L'aumento di TNF α indotto da MGO determina quindi uno stato infiammatorio a livello cellulare che può alimentare i processi ossidativi e apoptotici. E' possibile, suggerire che il TNF α possa determinare la formazione di ROS intracellulari attivando il processo apoptotico; queste condizioni favoriscono a loro volta la sintesi di citochine pro-infiammatorie come il TNF α che agirà autoalimentando i meccanismi che sollecitano la cellula a produrre ROS.

Lo stress ossidativo svolge un ruolo importante anche nella modulazione di meccanismi epigenetici come l'acetilazione e la deacetilazione, responsabili del rimodellamento della cromatina e regolazione dell'espressione genica.

Nella presente tesi è stata indagata, mediante RT-PCR e western blot, l'espressione dei principali marcatori epigenetici dell'acetilazione, deacetilazione e metilazione dopo il trattamento con MGO. Dai risultati ottenuti è emersa una significativa riduzione delle HDAC1-2 indice di una maggiore acetilazione degli istoni, dato che concorda con la maggiore espressione dell'istone H4 nelle cellule che hanno subito il trattamento.

Questi risultati sono indice di un possibile aumento nella trascrizione di alcuni geni coinvolti in processi apoptotici o infiammatori

La messa a punto di questo modello potrebbe rappresentare un punto di partenza per studi finalizzati a capire se molecole di natura antiossidante possano interferire con i meccanismi che causano l'accumulo di ROS intracellulare. E' stato dimostrato che composti come i polifenoli possono esercitare effetti antiossidanti diretti come scavengers di radicali liberi e quindi impedire la propagazione del danno ossidativo; pertanto è risultato interessante valutare l'effetto protettivo dei polifenoli estratti dai tepali di *Crocus sativus* nei confronti dell'effetto citotossico e il danno ossidativo indotto da MGO sulle cellule Caco-2. I dati mostrano una riduzione delle cellule apoptotiche di circa il 40% e un dimezzamento della percentuale di cellule ad alto contenuto di ROS.

In conclusione, i dati ottenuti fin ora dimostrano che l'esposizione delle cellule intestinali ad un agente citotossico come il metilgliosale induce uno stress glico-ossidativo che comporta un'alterazione delle difese antiossidanti e conseguente attivazione di pathways pro-apoptotici e processi infiammatori.

Tale modello ha una rilevanza fisiopatologica, infatti, la mucosa intestinale, è soggetta ad un elevato stress glico-ossidativo, per la sua continua esposizione alle specie reattive dell'ossigeno (ROS) e prodotti di glicazione avanzata

(AGEs) sia endogene, che esogene. Infatti, la glico-ossidazione avviene in condizioni di iperglicemia e anche negli alimenti in seguito a processi tecnologici. È stato dimostrato che i prodotti di ossidazione e/o AGEs presenti negli alimenti arrivano a livello intestinale e quindi vengono a contatto diretto delle cellule intestinali. Il consumo giornaliero di questi composti può essere compreso da 0-5 g/die (Henle T. et al. 2003). E' stato riportato che l'assunzione di AGEs (soprattutto MGO e GO) con la dieta può innescare a livello del tratto gastro-intestinale la formazione endogena di nuovi AGEs (Van der Lugt et al. 2020). Inoltre, carbonili reattivi come metilgliossale (MGO) e gliossale (GO), in grado di innescare la glico-ossidazione, derivano anche dal metabolismo batterico. E' stato riportato che batteri presenti nell'intestino umano come *Proteus spp.*, *Aeromonas*, *E. coli* e *Salmonella* sono in grado di produrre MGO grazie all'enzima metilgliossal-sintetasi a partire dal didroacetonefosfato derivante dalla glicolisi. La sintesi microbica di MGO rappresenta pertanto una delle maggiori cause della produzione di questi composti a livello intestinale.

Un eccessivo accumulo di prodotti di glicazione avanzata (AGEs) provoca stress ossidativo e innesca processi infiammatori sia nel lume che nella mucosa intestinale con conseguente danno alle cellule intestinali.

I danni indotti dalla glico-ossidazione a livello intestinale portano, pertanto, ad alterazioni della funzionalità della barriera intestinale, alla compromissione

della sua struttura causando una elevata erosione delle mucose. Questi eventi svolgono un ruolo fondamentale in numerose infezioni e nello sviluppo di malattie gastrointestinali come il morbo di Crohn e la colite ulcerosa (Kruidenier L. et al. 2003). L'azione dannosa esercitata da AGEs a livello intestinale è ancora più importante in condizioni patologiche. Infatti, è stato riportato che in condizioni patologiche quali diabete, patologie neurodegenerative e patologie infiammatorie portano ad una sovraregolazione del recettore RAGE in diversi tessuti come l'epitelio vascolare, ma anche il tratto gastro-intestinale (Body-Malapel M. et al. 2019).

6. BIBLIOGRAFIA

- **Ames B.** : Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science* 221:1256–63 (1983).
- **Ahmed N.** : Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract.*;67: 3-21.(2005)
- **Avery N. et al.** : The effects of the Maillard reaction on the physical properties and cell interactions of collagen. *Pathol Biol.* 54(7):387-95 (2006).
- **Bacchetti, T. et al.** :. Antioxidant and Pro-Oxidant Properties of Carthamus Tinctorius, Hydroxy Safflor Yellow A, and Safflor Yellow A, Antioxidants (Basel). 202, 119 (2020).
- **Baskaran S. et al.** : Formation of methylglyoxal by bacteria isolated from human faeces. *The Pathological Society of Great Britain and Ireland. J. Med. Microbiol.- Vol.28,211-215* (1989).
- **Bannister A. et al.**: Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 21(3), 381–395 (2011).
- **Bellachioma L. et al.**: Valorisation of *Crocus sativus* flower parts for herbal infusions: impact of brewing conditions on phenolic profiling, antioxidant capacity and sensory traits. *International Journal of Food Science and Technology* Vol 57, 6 3838-3849 (2022).

- **Bhattacharyya A. et al** : An essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal disease, *Physiol Rev* 94; 329-354 (2014).
- **Body-Malapel M. et al.** : The RAGE signaling pathway is involved in intestinal inflammation and represents a promising therapeutic target for Inflammatory Bowel Diseases. *Mucosal Immunology*. Mar;12(2):468-478 (2019).
- **Bowen Y. et al.** : Reactive Oxygen Species (ROS)-Based Nanomedicine. *Chem. Rev.* 119, 8, 4881–4985 April 11 (2019).
- **Brennan FM et al.** : Cytokine expression in chronic inflammatory disease. *Br Med Bull* 51:368–384 (1995).
- **Brownlee M. et al.** : Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med.*; 318:1315,1321 (1988).
- **Carrasco-Pozo C. et al.** : Apple peel polyphenols protect against gastrointestinal mucosa alterations induced by indomethacin in rats. *J Agric Food Chem.* Jun 22;59(12):6459-66 (2011).
- **Carrieri, M. et al.** : Assessment of exposure to oak wood dust using gallic acid as a chemical marker, *Int Arch Occup Environ Health.* 89, 115-21 (2016).

- **Celli A. et al .:** Glutathione depletion is associated with decreased Bcl-2 expression and increased apoptosis in cholangiocytes. *Am. J. Physiol. G* 749-G 757 (1998).
- **Cianfaruglia L. et al.:** Protection of Polyphenols against Glyco-Oxidative Stress: Involvement of Glyoxalase Pathway. *Antioxidants*, 9, 1006 (2020).
- **Covas MI, Gaddi AV. :** Relationship of olive oil polyphenols and oxidation biomarkers. *J Nutr*; 141(12):2256. 50 (2011).
- **De Caterina R. et al.:** . Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovasc Res* 63: 582–592 (2004).
- **De Bari L. et al. :**Interplay among Oxidative Stress, Methylglyoxal Pathway and S-Glutathionylation. *Antioxidants (Basel)*. Jan; 10(1): 19 (2021).
- **Degen G. et al. :** Metabolic Transit of Dietary Methylglyoxal. *J. Agric. Food Chem.* 61, 43, 10253–10260 (2013).
- **Devarajan A et al. :** Paraoxonase 2 deficiency alters mitochondrial function and exacerbates the development of atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal* 2011;14:341–51 (2011).

- **Di Tan et al.** : Methylglyoxal: Its Presence in Beverages and Potential Scavengers. *Asia Pac J Clin Nutr.*;17 Suppl 1:261-4. doi.org/10.1196/annals.1433.027 (2008).
- **Doyle K. et al.** : Redox signaling, alkylation (carbonylation) of conserved cysteines inactivates class I histone deacetylases 1, 2, and 3 and antagonizes their transcriptional repressor function. *J. Biol. Chem.* 285(23), 17417–17424 (2010).
- **Dupont C. et al.** : Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. *Semin Reprod Med.* Sep;27(5):351-7. (2009).
- **Duthie G. et al.** : Reducing the risk of cardiovascular disease. In *Functional Foods: Designer Foods, Pharmafoods, Nutraceuticals*; Chapman & Hall: New York, NY, USA, 19-38 (1994).
- **Egger G. et al.** : Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429, 457–463 (2004).
- **Forbes JM. et al.** : Advanced glycation end product interventions reduce diabetes-accelerated atherosclerosis. *Diabetes.*;53:1813-1823 (2004).
- **Forner-Piquer I. et al.** : Effects of BPA on zebrafish gonads: Focus on the endocannabinoid system. *Environmental Pollution* Volume 264, September, 114710 (2020).
- **Giorgi C. et al.** : *L'Oro Rosso delle Alpi: Manuale tecnico scientifico di produzione dello zafferano* (2015).

- **Goupy P. et al.** : Identification and quantification of flavonols, anthocyanins and lutein diesters in tepals of *Crocus sativus* by ultra performance liquid chromatography coupled to diode array and ion trap mass spectrometry detections. *Industrial Crops and Products* 44 496– 510 (2013).
- **Greco C.A. et al.:** PEGylation prevents bacteria-induced platelet activation and biofilm formation in platelet concentrates. *Vox Sang.* 100, 336–339 (2011).
- **Grivennikov S.** : Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia. *Semin. Immunopathol.*35, 229–24 (2013).
- **Halicka H. et al.** : Cytometric detection of chromatin relaxation, an early reporter of DNA damage response. *Cell Cycle Georget. Tex.* 8(14), 2233–2237 (2009).
- **Halliwell B.** : Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition. *Mutat Res* 443:37–52 (1999).
- **Halliwell B. et al.:** The gastrointestinal tract: a major site of antioxidant action? *Free Radic Res.* Dec;33(6):819-30 (2000).

- **Halpin S. et al.:** Prevalence of symptoms meeting criteria for irritable bowel syndrome in inflammatory bowel disease: systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol.*;107(10):1474-82 (2012).
- **Helmut S. :** Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.*;4:180-3. (2015).
- **Henle T. et al. :** Glycation in food and metabolic transit of dietary AGEs (advanced glycation end-products): studies on the urinary excretion of pyrraline. *Biochem Soc Trans* 31 (6): 1383–1385. Volume 31, Issue 6 (2003).
- **Hernandez-Castillo C. et al:** Diet and Obesity-Induced Methylglyoxal Production and Links to Metabolic Disease. *Chem. Res. Toxicol.* 34, 12, 2424–2440 (2021).
- **Hibi T. et al. :** Novel pathophysiological concepts of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol.* 41(1):10-6 (2006).
- **Hong Zhu et al. :** Oxidative stress and redox signaling mechanisms of inflammatory bowel disease: updated experimental and clinical evidence. *SAGE journals* May 1 (2012).
- **Indriolo A. et al. :**What can we learn about biofilm/host interactions from the study of inflammatory bowel disease. *J. Clin. Periodontol.* 38 (Suppl. 11), 36–43 (2011).

- **Izawa S. et al :** Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J.* Nov 15; 320 (Pt 1):61-7 (1996).
- **Jaouad Bouayed et al:** Exogenous antioxidants—Double-edged swords in cellular redox state. *Oxid Med Cell Longev.* Jul-Aug; 3(4): 228–237 (2010).
- **Jarrett J. et al. :** The mechanism of adenosylmethionine-dependent activation of methionine synthase: a rapid kinetic analysis of Intermediates in reductive methylation of Cob(II)alamin enzyme. *Biochemistry (Mosc.)*. 37(36), 12649–12658 (1998).
- **Kruidenier L et al. :** Differential mucosal expression of three superoxide dismutase isoforms in inflammatory bowel disease. *J Pathol* 201: 7–16, (2003).
- **Kauffman M. et al. :** MitoSOX-Based Flow Cytometry for Detecting Mitochondrial ROS. *React Oxyg Species (Apex)*; 2(5): 361–370 (2016).
- **Kruidenier L. et al. :** Oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease radicals or ridiculous? *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* Volume 16, Issue 12 p. 1997-2015 (2002).
- **Lane C. et al:** Solid Phase Extraction. *J Res Natl Inst Stand Technol.* 122: 1 (2017).

- **Magdalena L. Circu et al. :** Intestinal redox biology and oxidative stress. *Seminars in Cell & Developmental Biology* Volume 23, Issue 7, Pages 729-737 (2012).
- **Megan E Kauffman et Al. :** MitoSOX-Based Flow Cytometry for Detecting Mitochondrial ROS. *React Oxyg Species (Apex)* 2016;2(5):361-370. Epub Sep 1 (2016).
- **Marrugat J, et al .:** Effects of differing phenolic content in dietary olive oils on lipids and LDL oxidation - a randomized controlled trial. *Eur J Nutr*;43:140-7(2004).
- **Miller DL et al. :** Proliferation rate and transit time of mucosal cells in small intestine of the diabetic rat. *Gastroenterology* ;73:1326–32 (1977).
- **Miller DM. et al.:** Transition metals as catalysts of “autoxidation” reactions. *Free Radic Biol Med* 8:95–10 (1990).
- **Muller FM. et al. :** Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem* 279:49064–49073 (2004).
- **Morresi C. et al. :** Effect of High Glucose-Induced Oxidative Stress on Paraoxonase 2 Expression and Activity in Caco-2 Cells. *Journals Cells* (2019).

- **Nava Donatella** : Citofluorimetria a flusso. Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno
- **Nishikawa T. et Al** : Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*. Apr 13;404(6779):787-90. (2000).
- **Niu Y. et al.** : Oxidative stress alters global histone modification and DNA methylation. *Free Radic. Biol. Med.* 82, 22–28 (2015).
- **Nurbubu T. Moldogazieva et al.** : Oxidative Stress and Advanced Lipoxidation and Glycation End Products (ALEs and AGEs) in Aging and Age-Related Diseases. *Oxid Med Cell Longev.*; 2019: 3085756 (2019).
- **Pfaffl M.W.** : A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, 29 p. e45 (2001).
- **Piarulli M. et al.** : Glyco-oxidation and cardiovascular complications in type 2 diabetes: a clinical update. *Acta Diabetologica* volume 50, pages101–110 (2013).
- **Piechota-Polanczyk A. et al.** :The role of oxidative stress in pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* Jul; Epub May 6 (2014).

- **Pinto M. et al.:** Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol. Cell.* 47: 323–330 (1983).
- **Rahman K.:** Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions in Aging*:2(2): 219–236 (2007).
- **Remigante A. et al. :** Cellular and Molecular Mechanisms in Oxidative Stress-Related Diseases.. *Int J Mol Sci.* 2022 Jul; 23(14): 8017 (2022).
- **Sambuy Y. et al. :** The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol.* 21(1):1-26 (2005).
- **Sanders LM et al :** Pro-oxidant environment of the colon compared to the small intestine may contribute to greater cancer susceptibility. *Cancer Lett* 208:155–161 (2004).
- **Schalkwijk C. et al :** Methylglyoxal, a Highly Reactive Dicarbonyl Compound, in Diabetes, Its Vascular Complications, and Other Age-Related Diseases. *Physiol Rev* Jan 1;100(1):407-461 (2020).
- **Shahi T. et al. :** Chemical compounds and pharmacological activities of stigmas and tepals of ‘red gold’; saffron. *Trends in Food Science & Technology*, volume 58, (2016).

- **Shao X et al. :** Apple Polyphenols, Phloretin and Phloridzin: New Trapping Agents of Reactive Dicarbonyl Species. *Chem. Res. Toxicol.*, 21,2042-2050.(2008).
- **Simm A. et al.:** Advanced glycation end products: a biomarker for age as an outcome predictor after cardiac surgery? *Exp Gerontol*;42: 668-675 (2007).
- **Simmons D. :** Epigenetic influence and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 8(2): a019497 (2008).
- **Stitt AW. et Al :** The maillard reaction in eye diseases. *Ann N Y Acad Sci.*;1043:582-597 (2005).
- **Shuang Z. et al. :** Methylglyoxal Induces Systemic Symptoms of Irritable Bowel Syndrome. *PLoS One.*; 9(8): e105307 (2014).
- **Tabatabaie T. et al :** Reactive oxygen species-mediated inactivation of pyruvate dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys* 336:290–296 (1996).
- **Takeuchi T. et al.:** Relationship between the intracellular reactive oxygen species and the induction of oxidative DNA damage in human neutrophil-like cells. *Carcinogenesis* 17:1543–1548 (1996).

- **Thornalley P. et al.** : Negative association between erythrocyte reduced glutathione concentration and diabetic complications. *Clin Sci Lond*, 91(5):575-82.(1996).
- **Tuberoso G:** Antioxidant activity, cytotoxic activity and metabolic profiling of juices obtained from saffron (*Crocus sativus* L.) floral by-products food Chemistry 199 :18–27 (2016).
- **Trachootham D. et al.:** Targeting Cancer Cells by ROS-Mediated Mechanisms: A Radical Therapeutic Approach?. *Nat. Rev. Drug Discovery*, 8, 579– 591 (2009).
- **Tsunada S. et al.** : Redox imbalance in the colonic mucosa of ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 38:1002–1003 (2003).
- **Uribarri J. et al.** : Diet-derived advanced glycation end products are major contributors to the body’s AGE pool and induce inflammation in healthy subjects. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1043, 461-6 (2005).
- **Valko M. et al.** : Freeradicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*; 160:1–40 (2006).
- **Van der Lugt T. et al.** : Dietary Advanced Glycation Endproducts Decrease Glucocorticoid Sensitivity In Vitro. *Nutrients*, 12(2), 441 (2020).

- **Vistoli G. et al.** : Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation . *Ricerca Radicale Libera* Vol 47, sup1 (2013).
- **Vlassara H. et al.**: Pathogenic effects of advanced glycosylation: biochemical, biologic, and clinical implications for diabetes and aging, *journal of technical methods and pathology*, vol. 70, 138-151(1994).
- **Wieland. N. et al.** : Bioprocess monitoring: minimizing sample matrix effects for total protein quantification with bicinchoninic acid assay,» *J Ind Microbiol Biotechnol*, vol. 43, pp. 1271-1280 (2016).
- **Wu Ch et al.** : Dietary phenolic acids attenuate multiple stages of protein glycation and high glucose- stimulated pro-inflammatory IL-1 activation by interfering with chromatin remodeling and transcription in monocytes. *Mol. Nutr. Food Res.*, 54, S127-S140 (2010).
- **Yasukawa K. et al.** :The detrimental effect of nitric oxide on tissue is associated with inflammatory events in the vascular endothelium and neutrophils in mice with dextran sodium sulfate-induced colitis. *Free Radic Res* 46: 1427– 1436 (2012).