



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA

IN TOSSICOLOGIA
TOSSICOLOGIA DEGLI ALIMENTI E DELL'AMBIENTE

Ciclo XXV

TITOLO TESI

EFFETTO PRO-OSSIDANTE E PRO-INFIAMMATORIO
DEGLI OSSISTEROLI IN CELLULE INTESTINALI:
ATTIVITA' MODULATORIA DELLA FRAZIONE
FENOLICA DEL VINO

Settore scientifico disciplinare di afferenza

MED/04

Presentata da:	Dott.ssa BARBARA CABBOI
Coordinatore Dottorato	Prof. GAETANO DI CHIARA
Tutor/Relatore	Dott.ssa MONICA DEIANA

Esame finale anno accademico 2012 – 2013

Ringraziamenti

Giunta al termine del corso di Dottorato di Ricerca desidero ringraziare tutte le persone che in un modo o nell'altro hanno contribuito al raggiungimento di questo importante traguardo.

In primo luogo desidero ricordare con affetto la Prof.ssa Maria Assunta Dessì che mi ha accolto nel suo laboratorio di Patologia Sperimentale nel quale ho potuto apprendere le tecniche che mi hanno permesso di sviluppare questa tesi.

Ringrazio la Dott.ssa Monica Deiana che con grande costanza e pazienza mi ha guidato nel mio percorso di ricerca e seguito nella realizzazione di questa tesi di dottorato.

La Dott.ssa Maria Paola Melis, la Dott.ssa Antonella Rosa, la Dott.ssa Angela Atzeri, la Dott.ssa Alessandra Incani, la Dott.ssa Debora Loru e la Dott.ssa Gessica Serra per il loro costante aiuto e per aver condiviso con me la loro esperienza in campo lavorativo e non solo... insieme abbiamo vissuto momenti più o meno belli.

Giacomo Satta per aver reso meno pesanti le mie giornate in laboratorio.

Il Prof. Giuseppe Poli, la Prof.ssa Fiorella Biasi, la Prof.ssa Gabriella Leonarduzzi e la Prof.ssa Elena Chiarpotto per avermi ospitato nel loro laboratorio di Scienze Cliniche e Biologiche dell'Università di Torino e per avermi permesso di acquisire nuove conoscenze. Un grazie particolare alla Prof.ssa Biasi per avermi seguito sia nel mio lavoro di ricerca che nella stesura della tesi.

Il Dott. Marco Maina, la Dott.ssa Tina Guina, il Dott. Simone Calfapietra, la Dott.ssa Barbara Sottero, la Dott.ssa Simona Gargiulo, la Dott.ssa Paola Gamba e la Dott.ssa Gabriella Testa per il loro costante aiuto e per aver condiviso con me la loro esperienza in campo lavorativo e non solo.

Non posso nominare tutti ma voglio ringraziare tutte le persone che ho conosciuto all'Ospedale San Luigi Gonzaga con le quali ho condiviso esperienze, viaggi, cene e qualche risata.

Grazie davvero a tutti per avermi fatto sentire fin da subito una di voi e per aver reso più sopportabile la lontananza da casa... vi porterò sempre nel mio cuore.

Infine, ma sicuramente non per importanza, desidero ringraziare mio marito Tore che con grande amore e pazienza mi è stato vicino durante questo percorso e i miei genitori, mia sorella, mia suocera, i miei cognati e mia nipote che mi hanno sostenuto in questo percorso.

Grazie a tutti voi per aver condiviso con me i momenti di gioia ed avermi sostenuto nei momenti di sconforto e soprattutto per aver sempre creduto in me ed avermi incoraggiato.

Abstract

Because the intestine sits at the interface between the organism and its luminal environment, it represents a critical defense barrier against luminal toxic agents. Thus, in addition to being exposed to luminal nutrients, the intestinal mucosa is constantly challenged by diet-derived oxidants, mutagens, and carcinogens as well as by endogenously generated reactive oxygen species.

Among the oxidizing agents cholesterol oxidation products, oxysterols, are particularly relevant; besides being generated endogenously, they may be introduced with the diet. Oxysterols are involved in physiological processes, but they also exert several detrimental effects including cytotoxicity, induction of cell death, carcinogenicity and pro-oxidative and pro-inflammatory activities. These compounds have recently been suggested to be associated with the pathogenesis of inflammatory bowel diseases (IBD), and with a high risk of developing colorectal cancer.

There is an increasing interest in the mechanisms of response of the intestinal epithelium to oxidative stress and in the capability of nutritional antioxidants to strengthen endogenous antioxidant defenses. Among dietary-derived antioxidants, phenolic compounds have been described to have a wide range of biological activities and many reports have illustrated their promising role as preventive tools in several acute and chronic disorders. Phenolic compounds are absorbed and extensively metabolized *in vivo*: however, the percentage of absorption does not exceed a few percent of the ingested dose. It is assumed that dietary polyphenols may display their first antioxidant defense in the digestive tract, where they concentrate, both through their “conventional“ antioxidant capacity, limiting ROS formation and scavenging them, and by an “indirect” antioxidant effect, inducing endogenous protective enzymes and/or regulating cellular process such as inflammation.

Wine accounts for a very high proportion of phenolic compounds intake in the Mediterranean diet; typically a glass of red wine contains about 100 mg of compounds generally called polyphenols.

We investigated the ability of two wine phenolic extracts, obtained from grape varieties grown in Sardinia, Cannonau (red) and Vermentino (white), to exert a protective action against the pro-oxidative and pro-inflammatory effect of oxysterols in Caco-2 cells, a cell line

with enterocyte-like features, as a model system that mimics the insult of dietary oxidized lipids on the intestinal mucosa.

Oxidative damage was induced by treating cells with a dietary-representative oxysterols mixture (7-ketocholesterol, 5 α ,6 α -epoxycholesterol, 5 β ,6 β -epoxycholesterol, 7 α -hydroxycholesterol and 7 β -hydroxycholesterol); malondialdehyde (MDA) production was evaluated as marker of oxidative damage, together with cell death. Changes in the cellular redox state were evaluated determining the glutathione peroxidase (GPx) activity, the variation of GSH concentration, NADPH oxidase 1 (NOX1) activation and ROS generation. Twenty-four hours exposure to oxysterols induced cell death and MDA production, together with a significant loss of GSH, just after 30 min of incubation. An increase in the GPx activity was observed 18 hours after treatment. Pretreatment with both the wine phenolic extracts protected Caco-2 cells from oxidative damage and the level of GSH was preserved; a further increase of the GPx activity was observed in cells pretreated with wine fenolic extracts in agreement with previous studies.

Oxysterols oxidizing action was due, at least in part, to the generation of intracellular ROS, as demonstrated by the use of a fluorescent probe. Since the increase of ROS levels by oxysterols in Caco-2 cells has been reported to involve modulation of NOX1, we also measured the activation of this enzyme; oxysterols treatment significantly enhanced the activity of NOX1. Wine phenolic extracts pretreatment reduced ROS formation, probably by a scavenging direct action, but also through the modulation of NOX1 activity, which was significantly inhibited by the extracts.

In view of recent studies reporting that oxysterols may induce an increase of ROS production through an enhanced expression of NOX1 in Caco-2 cells in association with an increase of inflammatory cytokine production (IL-6 and IL-8), we investigated the antiinflammatory effect of the wine phenolic extracts, by measuring the release of IL-6 and IL-8 by Caco-2 cells treated with the oxysterols mixture. Differentiated Caco-2 cells in fact have been reported to be also an excellent in vitro model of intestinal inflammation, responding to different inflammatory stimuli.

Cannonau phenolic extract exerted a significant antiinflammatory activity, inhibiting the release of the two interleukins.

Finally, we evaluated the signaling pathways modulated by oxysterols and wine phenolic extracts with the aim of clarifying the molecular mechanism involved in the antioxidant and

ant inflammatory activity. For this purpose the possible modulation of the MAPKs cascade was analyzed in Caco-2 treated with oxysterols. These kinases have been reported to be activated by various stress stimuli, and they have been also implicated in oxysterols induced cytokine secretion and apoptosis.

Under our experimental conditions, the oxysterols mixture was not able to modulate ERK phosphorylation, but induced p38 and JNK pathways activation.

Pretreatment with both the wine phenolic extracts significantly inhibited p38 and JNK phosphorylation.

The results of this study support a potential role for wine phenolic compounds in preventing oxysterols induced oxidative damage and inflammatory cytokine production in Caco-2 cells. We suggest that wine phenolic compounds exerted such a preventive effect through a mechanism involving a direct scavenging of ROS and/or an inhibition of NOX1, which in turn affected ROS production and redox sensitive MAPKs, p38 and JNK, expression and interleukins release.

Although further studies are needed, our results point out for the first time a direct antioxidant and ant inflammatory action of the phenolic fraction from the red wine Cannonau and the white wine Vermentino on enterocytes exposed to oxidizing species. These data have an interesting biological significance, suggesting the possibility that, together with their metabolites, wine polyphenols may significantly contribute to preserve the integrity of intestinal mucosa against oxidative damage and inflammation related disorders. Our data also support the opinion that total phenolic content, as well as wine's color, are not essential for the antioxidant activity of a wine extract; although the extract obtained from the red wine Cannonau was effective at lower concentrations and in all the experimental conditions, the extract obtained from the white wine Vermentino showed basically a comparable efficacy.

INDICE

<i>Prefazione</i>	I
1 INTRODUZIONE	1
1.1 Patologie intestinali	2
1.2 Ossisteroli	5
1.2.1 Ossisteroli e ossidazione	9
1.2.2 Ossisteroli e infiammazione	12
1.2.3 Ossisteroli a livello intestinale	14
1.3 Tossicità degli ossisteroli: modulazione della NADPH ossidasi e delle MAPKs.....	20
1.3.1 NADPH ossidasi (NOX)	20
1.3.2 MAPKs.....	24
1.3.2.1 ERK - interazione con gli ossisteroli	25
1.3.2.2 p38 - interazione con gli ossisteroli	28
1.3.2.3 JNK - interazione con gli ossisteroli.....	30
1.4 Difese intestinali contro il danno ossidativo	32
1.4.1 Antiossidanti enzimatici	34
1.4.1.1 Glutazione perossidasi (GPxs)	35
1.4.2 Antiossidanti non enzimatici	41
1.4.2.1 Glutazione (GSH)	44
1.5 Il vino e i vitigni: Cannonau e Vermentino	52
1.6 Composizione del vino	56
1.7 Fenoli del vino	59
1.7.1 Non-flavonoidi	59
1.7.2 Flavonoidi	62
1.8 Attività biologiche dei polifenoli: attività antiossidante e anti-infiammatoria.....	65
2 SCOPO DEL LAVORO	68
3 MATERIALI E METODI	71
3.1 Reagenti e sostanze chimiche	72
3.2 Apparecchiature.....	73
3.3 Preparazione degli estratti fenolici di vino	74
3.4 Colture cellulari	76
3.4.1 Mantenimento delle colture cellulari.....	76
3.5 Citotossicità nelle cellule Caco-2 differenziate	77
3.5.1 Metodica del Neutral Red.	77
3.6 Determinazione della produzione di malonildialdeide (MDA).....	79

3.6.1	Metodica del TBARS	79
3.6.2	Analisi in HPLC	79
3.7	Valutazione dell'attività della glutatione perossidasi (GPx)	80
3.8	Determinazione del glutatione (GSH)	81
3.9	Determinazione della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS)	82
3.10	Valutazione dell'attività della NADPH OSSIDASI 1 (NOX1)	84
3.11	Valutazione della sintesi di interleuchina 6 (IL-6) e interleuchina 8 (IL-8)	85
3.12	Modulazione dei segnali intracellulari	86
3.12.1	Trattamento delle cellule	86
3.12.2	Estrazione e quantificazione delle proteine	86
3.13	Analisi statistiche	88
4	RISULTATI	89
4.1	CITOTOSSICITA' DELLA MISCELA DI OSSISTEROLI E ATTIVITA' PROTETTIVA DEGLI ESTRATTI FENOLICI DI VINO	90
4.2	AZIONE ANTIOSSIDANTE DEGLI ESTRATTI FENOLICI DI VINO	93
4.2.1	Misura della produzione della malonildialdeide (MDA)	93
4.2.2	Modulazione dell'attività della Glutatione perossidasi (GPx)	96
4.2.3	Determinazione della quantità di glutatione (GSH)	99
4.2.4	Produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS)	102
4.2.5	Modulazione dell'attività della NADPH ossidasi 1 (NOX1)	103
4.3	AZIONE ANTI-INFIAMMATORIA DEGLI ESTRATTI FENOLICI DI VINO	104
4.3.1	Induzione della sintesi di interleuchina 6 (IL-6) e interleuchina 8 (IL-8)	104
4.4	AZIONE MODULATORIA DEGLI ESTRATTI FENOLICI DI VINO	112
4.4.1	Modulazione delle MAPKs	112
5	DISCUSSIONE	117
6	BIBLIOGRAFIA	125

Prefazione

I popoli che vivono nelle nazioni del Mediterraneo consumano quantità relativamente elevate di grassi ma, nonostante ciò, hanno un tasso di insorgenza minore di malattie cardiovascolari rispetto alla popolazione statunitense, nella cui alimentazione sono presenti livelli simili di grassi animali.

La dieta mediterranea è un modello nutrizionale ispirato alle abitudini alimentari tradizionali dei paesi del bacino del Mar Mediterraneo, in particolare Italia meridionale, Grecia e Spagna. Questo modello è caratterizzato da un elevato consumo di frutta e verdura, pane, erbe aromatiche, cereali, olio extravergine di oliva e pesce, nonché da un consumo di vino in quantità moderate.

Il vino è una bevanda millenaria tipica della civiltà mediterranea. Se da un lato numerosi studi hanno chiaramente evidenziato i rischi dell'insorgenza di gravi patologie legate all'abuso di alcol, dall'altro si stanno accumulando evidenze sperimentali a supporto degli effetti positivi legati ad un consumo moderato di vino.

L'interesse del mondo scientifico nei confronti dei potenziali benefici del consumo moderato di questa bevanda ha preso il via da studi epidemiologici che hanno evidenziato una correlazione inversa tra il consumo di vino rosso e l'incidenza di malattie cardiovascolari, un fenomeno comunemente noto come "paradosso francese", un termine che è stato coniato per indicare il fatto che l'incidenza di infarto cardiaco in Francia è inferiore di circa il 40% rispetto al resto d'Europa, nonostante una dieta che per tradizione è ricca di grassi saturi.

Gli effetti cardioprotettivi del vino sono stati attribuiti alla presenza della frazione fenolica, in particolare al resveratrolo; poiché questa molecola è sintetizzata esclusivamente nell'epidermide delle foglie e nelle bucce, ma non nella polpa e le bucce non vengono fermentate nel processo di produzione di vini bianchi, solo i vini rossi contengono notevoli quantità di questo composto.

Recenti studi, tuttavia, hanno dimostrato che anche alcuni vini bianchi potrebbero svolgere un'azione cardioprotettiva simile a quella esplicita dal vino rosso, riducendo lo stress ossidativo e la risposta infiammatoria.

Tra le differenti varietà di vino rosso e bianco della Sardegna meritano particolare attenzione due vini ottenuti da vitigni autoctoni, il Cannonau (rosso) e il Vermentino (bianco), che potrebbero spiegare effetti benefici sulla salute grazie alla presenza di composti fenolici.

I polifenoli del vino, oltre a contribuire alle caratteristiche organolettiche come il colore, l'astringenza e l'amarrezza, sembrano esercitare un'azione di prevenzione nelle più comuni patologie alla cui base vi è il danno ossidativo e/o l'infiammazione, come il diabete, le patologie cardiovascolari, neoplastiche e neurodegenerative.

I polifenoli generalmente sono poco assorbiti dall'intestino, largamente metabolizzati e rapidamente eliminati e raramente raggiungono concentrazioni ematiche di rilievo; la maggior parte rimane a livello intestinale. È verosimile che proprio in questa sede le sostanze fenoliche svolgano la loro azione protettiva contro il danno ossidativo. L'intestino, infatti, essendo un sito di interfaccia tra l'interno e l'esterno dell'organismo, è particolarmente esposto all'azione di agenti ossidanti endogeni o provenienti dalla dieta.

Fra gli agenti ossidanti sono particolarmente rilevanti i prodotti di ossidazione del colesterolo, gli ossisteroli, che, oltre ad essere generati endogenamente, possono essere introdotti con la dieta in quanto presenti in diversi alimenti contenenti colesterolo, in particolare quelli sottoposti a lavorazione e/o conservazione per lunghi periodi non sottovuoto.

Nell'organismo, gli ossisteroli svolgono importanti funzioni fisiologiche ma mostrano anche diversi effetti dannosi tra i quali citotossicità, induzione della morte cellulare per apoptosi o necrosi ed effetti pro-cancerogeni, pro-ossidanti e pro-infiammatori; recentemente è stata suggerita un'associazione di questi composti con lo sviluppo delle patologie infiammatorie intestinali o IBD e con un aumento del rischio di sviluppare vari tipi di tumore a livello gastrointestinale.

L'intestino, per preservare la propria integrità possiede diversi meccanismi di difesa, come mantenere alte le concentrazioni di antiossidanti, regolare i sistemi enzimatici, indurre morte cellulare per apoptosi in enterociti malfunzionanti o danneggiati. Questi meccanismi di difesa possono tuttavia non essere sufficienti a contrastare l'attacco radicalico cui la mucosa intestinale è continuamente esposta; l'introduzione con la dieta di sostanze antiossidanti coadiuva l'azione delle difese endogene, svolgendo un ruolo importante nella prevenzione di diverse patologie legate allo stress ossidativo e/o all'infiammazione.

1 INTRODUZIONE

1.1 Patologie intestinali

Le principali malattie intestinali possono dividersi in:

- sindromi da malassorbimento
- gastroenteriti acute (batteriche, virali, parassitarie)
- malattie infiammatorie croniche
- sindromi ostruttive, paralitiche o da alterata motilità intestinale
- patologie vascolari
- disordini congeniti
- tumori

Le due principali patologie infiammatorie croniche dell'intestino (Inflammatory Bowel Diseases o IBD) sono il morbo di Crohn (MC) o enterite regionale e la colite ulcerosa (CU). Entrambe sono infiammazioni che presentano caratteristiche simili: sono malattie idiopatiche, croniche e recidivanti (presentano cioè dopo l'esordio periodi di quiescenza e riattivazione). Sebbene le due malattie abbiano di solito caratteristiche clinico-patologiche sufficientemente distinte, non è del tutto chiaro se ci troviamo di fronte a due entità separate o ad una diversa espressione di un medesimo meccanismo patogenetico. L'eziologia è tuttora sconosciuta, anche se sono state invocate una predisposizione genetica, cause infettive, ambientali (dieta), psicologiche (non è raro che l'inizio della malattia o le riacutizzazioni siano associate a importanti stress psicologici, come la perdita di un familiare) e autoimmunitarie. Sicuramente l'ipotesi eziopatogenetica attualmente più accreditata è quella di una predisposizione genetica a sviluppare una patologia autoimmunitaria. Sembra che nei pazienti con IBD il meccanismo patogenetico di base sia una ridotta capacità (probabilmente a causa di difetti genetici) di controllare e modulare la risposta infiammatoria che si verifica normalmente nell'intestino quando la mucosa viene a contatto con stimoli antigenici luminali (in particolare con antigeni della parete batterica o enterotossine).

Il MC (o enterite regionale) è un'affezione granulomatosa di tipo ulcero-costrittivo che coinvolge tutti gli strati della parete intestinale ed anche il mesentere ed i linfonodi regionali. A differenza della CU, il fumo rappresenta un fattore di rischio. Il MC può interessare qualsiasi porzione del tratto gastrointestinale a partire dalla bocca, ma si riscontra più di frequente nell'intestino tenue terminale e nel colon. La malattia può coinvolgere l'ileo e il cieco, solo l'ileo terminale o solo il colon. Caratteristica della malattia è la discontinuità delle

aree infiammate; le lesioni sono “a salto”, intervallate da zone normali, da cui il nome di enterite regionale. L'incidenza del carcinoma del colon è aumentata, ma non come nella colite ulcerosa.

La CU è una malattia ulcero-infiammatoria cronica che, come il MC, ha un andamento tipicamente ricorrente. Essa coinvolge il retto nel 95% dei casi, ma l'infiammazione può estendersi in modo retrogrado e continuo al colon per una distanza variabile fino a coinvolgerlo completamente in alcuni casi (pancolite). Nel 10% dei soggetti con pancolite può essere coinvolta anche la mucosa dell'ileo terminale. Non vi è mai estensione ad altre zone del tratto digerente. Le caratteristiche fondamentali dell'infiammazione sono la distribuzione continua, e non saltatoria come nel MC, ed il coinvolgimento limitato alla sola mucosa. C'è un aumento del rischio di insorgenza del carcinoma rettale ed un'incidenza molto maggiore di adenocarcinoma del colon.

I tumori intestinali possono insorgere sia nell'intestino tenue sia nel crasso anche se con frequenza differente (i tumori del tenue sono rari, mentre il colon/retto è una delle parti dell'organismo più colpite da neoplasie primitive). I tumori intestinali si possono classificare in: lesioni epiteliali neoplastiche [benigne (polipi adenomatosi) o maligne (adenocarcinoma, carcinoide, carcinoma del retto)] o lesioni mesenchimali [benigne (leiomioma, lipoma, angioma) o maligne (leiomiosarcoma, liposarcoma, sarcoma di Kaposi)]. I tumori più frequenti sono quelli di origine epiteliale.

I tumori dell'intestino tenue costituiscono solo il 2-3% di tutti i tumori che insorgono nell'intestino, nonostante il tenue rappresenti il 90% della superficie intestinale, e la maggior parte di essi è benigna (leiomiomi, adenomi e lipomi). Il motivo per cui le neoplasie sono rare nel tenue è ignoto. Rispetto alle neoplasie primitive, in questa porzione intestinale è invece più comune la presenza di metastasi, soprattutto di tumori che originano nella cavità addominale (colon, pancreas e ovaio). In ordine decrescente di frequenza, i tumori maligni che originano nell'intestino tenue sono i tumori carcinoidi, gli adenocarcinomi (con un'incidenza quasi sovrapponibile ai primi) ed i linfomi maligni.

Per quanto riguarda i tumori dell'intestino crasso, la maggior parte dei polipi intestinali insorge sporadicamente soprattutto nel colon con una frequenza che aumenta con l'età. Nel 90% dei casi si tratta di polipi non neoplastici, mentre gli adenomi sono polipi displastici premaligni che si presentano con un differente aspetto macro e microscopico ed un potenziale di trasformazione maligna (adenocarcinoma) variabile. L'adenocarcinoma coloretale

costituisce circa il 95% dei tumori del colon e rappresenta la seconda causa di morte per cancro sia negli uomini che nelle donne (**Celotti F., 2002**).

Diversi studi hanno evidenziato che l'insorgenza di patologie intestinali, come le IBD e alcune forme di tumore, è legata allo stress ossidativo e all'infiammazione.

Si pensa, infatti, che lo stress ossidativo giochi un ruolo chiave nello sviluppo del danno intestinale nelle IBD, a causa del suo coinvolgimento primario nella anomala risposta immunitaria e infiammatoria delle cellule intestinali verso antigeni alimentari e batteri commensali. Durante la fase attiva della malattia i leucociti attivati generano non solo un ampio spettro di citochine pro-infiammatorie, ma anche un eccesso di reazioni ossidative, che alterano marcatamente l'equilibrio redox nella mucosa intestinale e sostengono l'infiammazione inducendo vie di segnalazione redox-sensibili e fattori di trascrizione. Inoltre, diverse molecole infiammatorie generano ulteriori prodotti di ossidazione, portando ad un autosufficiente e auto-amplificato circolo vizioso, che alla fine danneggia la barriera intestinale (**Biasi F. et al., 2013c**).

Inoltre, l'infiammazione cronica sembra essere un importante fattore nello sviluppo della cancerogenesi (**Federico A. et al., 2007; Reuter S. et al., 2010**). È ampiamente noto che il cancro coloretale è una complicanza di uno stato di infiammazione cronica nell'intestino. Pazienti con patologie infiammatorie intestinali (CU e MC) hanno un rischio 6 volte maggiore di sviluppare il tumore coloretale rispetto alla popolazione generale (**Barrett C.W. et al., 2013**). Un'eccessiva e incontrollabile produzione di specie reattive dell'ossigeno per un periodo di tempo prolungato comporta un danno persistente delle cellule nel tessuto e di conseguenza un'infiammazione cronica. Oltre alle cellule danneggiate, anche le cellule infiammatorie producono mediatori solubili, che agiscono da ulteriore reclutamento di cellule infiammatorie al sito della lesione e producono ulteriori specie reattive (**Reuter S. et al., 2010; Gu Y. et al., 2013**). Questo ambiente ossidativo/infiammatorio porta ad una maggiore produzione di prodotti di ossidazione, come gli idroperossidi, che possono danneggiare le cellule epiteliali e stromali sane in prossimità delle lesioni, e a lungo andare può portare alla cancerogenesi (**Perse M., 2013**).

È stato dimostrato che fra i prodotti di ossidazione legati alla patogenesi delle IBD e all'incremento del rischio di sviluppare il cancro coloretale un ruolo centrale è svolto dagli ossisteroli, a causa del loro effetto pro-ossidante e pro-infiammatorio (**Biasi F. et al., 2013a**).

1.2 Ossisteroli

Gli ossisteroli sono i prodotti di ossidazione del colesterolo, uno sterolo che nella maggior parte degli animali è il precursore degli acidi biliari, della vitamina D₃ e degli ormoni steroidei; è inoltre un costituente chiave delle membrane cellulari di cui media fluidità e permeabilità. La maggior parte viene sintetizzata dal fegato e altri tessuti, ma una parte viene assorbita con la dieta. La fonte principale di colesterolo nella dieta sono i prodotti di origine animale (**Hur S.J. et al., 2007**).

Essendo un lipide monoinsaturo, quindi una molecola con un legame insaturo o doppio legame sul carbonio 5, è suscettibile all'ossidazione in presenza di ossigeno, luce, calore, radiazioni, radicali liberi, ioni metallici e altri fattori (**Hur S.J. et al., 2007**).

Gli ossisteroli, sono un gruppo di steroli che sono simili nella struttura al colesterolo ma contengono un addizionale gruppo idrossi, chetone o epossido nel nucleo sterolico e/o un gruppo idrossile nella catena laterale delle loro molecole (**Hur S.J. et al., 2007; Brown A.J. and Jessup W., 2009**). Vengono generati *in vivo* per via non enzimatica in seguito al processo di ossidazione dei lipidi nelle membrane biologiche e nelle lipoproteine (**Lyons M.A. and Brown A.J., 1999; Salonen J.T., 2000**) o per via enzimatica, durante il catabolismo del colesterolo (**Salonen J.T., 2000**).

In generale, gli ossisteroli biologici rientrano in due principali categorie: quelli ossigenati nell'anello sterolico, principalmente in posizione 7 (es.: 7 α / β -idroperossicolesterolo, 7-chetocolesterolo e 7 α / β -idrossicolesterolo) e quelli ossigenati nella catena laterale (es.: 24-idrossicolesterolo, 25-idrossicolesterolo e 27-idrossicolesterolo) (**Brown A.J. and Jessup W., 2009**). Generalmente, gli steroli ossigenati nell'anello tendono a essere formati non-enzimaticamente, mentre gli steroli ossigenati nella catena laterale solitamente hanno un'origine enzimatica (**Brown A.J. and Jessup W., 2009; Ryan E. et al., 2009**). Tuttavia ci sono eccezioni a questa regola, il 25-idrossicolesterolo e il 7 α -idrossicolesterolo per esempio possono essere prodotti sia per via enzimatica che non-enzimatica (**Brown A.J. and Jessup W., 2009; Otaegui-Arrazola A. et al., 2010**).

La presenza di un doppio legame rende il colesterolo suscettibile all'attacco radicalico in modo simile a quello subito dagli acidi grassi polinsaturi (PUFA) e determina l'estrazione di un atomo di idrogeno con conseguente formazione di un sito radicalico sul carbonio 7, che reagisce successivamente con l'ossigeno molecolare, producendo un radicale perossilico.

Questo radicale conserva la capacità di estrarre un ulteriore atomo di idrogeno da una molecola lipidica, generando il 7 α -idroperossicolesisterolo che, per successiva epimerizzazione, si trasforma in 7 β -idroperossicolesisterolo, isomero con una conformazione più stabile che si forma in modo predominante. I due idroperossidi sono comunque prodotti instabili e vengono rapidamente ridotti nei corrispondenti idrossiderivati: 7 α -idrossicolesisterolo e 7 β -idrossicolesisterolo o disidratati con formazione di un oxo-derivato, il 7-chetocolesisterolo (Salonen J.T., 2000; Adachi J. et al., 2001; Evangelisti F., 2003; Brown A.J. and Jessup W., 2009); l'ossidazione può anche continuare enzimaticamente e, in questo caso, vengono ridotti a epossicolesisteroli (Otaegui-Arrazola A. et al., 2010).

Gli ossisteroli, oltre ad essere generati endogenamente, attraverso reazioni enzimatiche o non enzimatiche, possono derivare dalla dieta (Biasi F. et al., 2008; Biasi F. et al., 2009; Biasi F. et al., 2013a), in quanto sono presenti in diversi alimenti, in particolare alimenti ricchi di colesisterolo come burro chiarificato, latte (Guardiola F. et al., 2002), latte in polvere (Leonarduzzi G. et al., 2002), prodotti lattiero-caseari, uova, uova in polvere, pesce essiccato o conservato (Guardiola F. et al., 2002; Leonarduzzi G. et al., 2002), carne (Leonarduzzi G. et al., 2002) e prodotti a base di carne (Guardiola F. et al., 2002). Generalmente, i prodotti contenenti colesisterolo sono suscettibili all'ossidazione, soprattutto i prodotti alimentari disidratati, soggetti a radiazioni o sottoposti ad alte temperature, così come quelli che vengono cotti in presenza di ossigeno (Guardiola F. et al., 2002; Leonarduzzi G. et al., 2002). Infatti, in tutte queste condizioni, il colesisterolo alimentare è esposto a numerose specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Leonarduzzi G. et al., 2002; Vejux A. et al., 2008; Vejux A. and Lizard G., 2009). Non solo la lavorazione ma anche la conservazione per lunghi periodi non sotto vuoto aumenta marcatamente la formazione di ossisteroli, per la stessa ragione (Leonarduzzi G. et al., 2002).

Gli ossisteroli più comunemente rilevati negli alimenti trasformati sono gli steroli 7-ossigenati (7-chetocolesisterolo, 7 α -idrossicolesisterolo, 7 β -idrossicolesisterolo) e gli steroli 5,6-ossigenati (5 α ,6 α -eossicolesisterolo, 5 β ,6 β -eossicolesisterolo, colestano-3 β ,5 α ,6 β -triolo), nonché il 25-idrossicolesisterolo, il 19-idrossicolesisterolo, il 20 α -idrossicolesisterolo, il 3 β -idrossi-5 α -colestano-6-one e il 3 β ,5 α -diidrossicolestano-6-one, che sono presenti in quantità minori (Guardiola F. et al., 2002; Leonarduzzi G. et al., 2002).

Gli ossisteroli alimentari vengono principalmente assorbiti come esteri nel tratto intestinale superiore e trasportati nel plasma dai chilomicroni prima (Leonarduzzi G. et al., 2002;

Vejux A. et al., 2008; Vejux A. and Lizard G., 2009) e dalle altre classi lipoproteiche poi (**Vejux A. et al., 2008; Vejux A. and Lizard G., 2009**). Livelli più elevati di ossisteroli sono presenti nelle lipoproteine a bassa densità (LDL) ed in misura minore nelle lipoproteine ad alta densità (HDL) e nelle lipoproteine a densità molto bassa (VLDL). Alcuni studi hanno inoltre dimostrato che gli ossisteroli possono essere trasportati dall'albumina (**Babiker A. and Diczfalusy U., 1998; Guardiola F. et al., 2002**). Rispetto al colesterolo, gli ossisteroli vengono assorbiti più rapidamente nell'intestino, hanno una liberazione plasmatica più rapida e sono rapidamente captati dai tessuti (**Krut L.H. et al., 1997**).

Gli ossisteroli svolgono importanti funzioni fisiologiche come regolatori dell'espressione di geni coinvolti nella biosintesi di lipidi e steroli (**Brown M.S. and Goldstein J.L., 1974; Kandutsch A.A. and Chen H.W., 1974; Brown A.J. and Jessup W., 2009**), come substrati per la formazione degli acidi biliari (**Danielsson H. et al., 1984; Brown A.J. and Jessup W., 2009**), nel trasporto dello sterolo tra i tessuti (**Brown A.J. and Jessup W., 2009**) e come mediatori del trasporto inverso del colesterolo con cui l'eccesso di colesterolo viene restituito al fegato per l'escrezione (**Bjorkhem I. et al., 1994; Lutjohann D. et al., 1996; Norlin M. et al., 2000; Olkkonen V.M. and Lehto M., 2004; Bjorkhem I., 2007**). In normali condizioni, gli ossisteroli coinvolti in questi processi sono mantenuti a livelli molto bassi e controllati, solitamente in presenza di un grande eccesso (circa 1000 volte) di colesterolo (**Brown A.J. and Jessup W., 2009**).

Queste molecole mostrano anche diversi effetti dannosi come citotossicità (**Smith L.L. and Johnson B.H., 1989; Adachi J. et al., 2001; Evangelisti F., 2003; Vejux A. et al., 2008; Vejux A. and Lizard G., 2009**), cancerogenicità, mutagenicità (**Smith L.L. and Johnson B.H., 1989; Adachi J. et al., 2001; Evangelisti F., 2003**), aterotossicità (**Evangelisti F., 2003**), angiotossicità, inibiscono la mitosi (**Smith L.L. and Johnson B.H., 1989; Adachi J. et al., 2001**), inducono la necrosi (**Vejux A. et al., 2008; Vejux A. and Lizard G., 2009**) o l'apoptosi, oltre ad avere effetti pro-ossidanti (**Smith L.L. and Johnson B.H., 1989; Adachi J. et al., 2001; Vejux A. et al., 2008; Biasi F. et al., 2009; Vejux A. and Lizard G., 2009**) e pro-infiammatori (**Vejux A. et al., 2008; Vejux A. and Lizard G., 2009; Mascia C. et al., 2010**).

Gli ossisteroli sono ormai considerati potenzialmente coinvolti nell'avvio e nella progressione delle principali malattie croniche tra cui l'aterosclerosi, i processi neurodegenerativi, il diabete, l'insufficienza renale e l'intossicazione da etanolo (**Guardiola F. et al., 1996**;

Guardiola F. et al., 2002; Sottero B. et al., 2009). Inoltre, potrebbero contribuire allo sviluppo della degenerazione maculare correlata all'età (**Malvitte L. et al., 2006**), della cataratta (**Girao H. et al., 1998**) e dell'osteoporosi (**Liu H. et al., 2005**) e sono stati associati a vari tipi di tumore (**Jusakul A. et al., 2011**).

1.2.1 *Ossisteroli e ossidazione*

Indagini epidemiologiche ed esperimenti condotti sugli animali hanno fornito prove a sostegno del ruolo della perossidazione lipidica nell'aterogenesi e nelle malattie cardiovascolari (**Berliner J.A. and Heinecke J.W., 1996; Kroon P.A., 1997; Ferderbar S. et al., 2007**), nella degenerazione maculare correlata all'età (**Kopitz J. et al., 2004**) e nella malattia di Alzheimer (**Bjorkhem I., 2006; Vaya J. and Schipper H.M., 2007**). Alcuni studi hanno indicato che le lipoproteine a bassa densità ossidate (LDLox), note per contenere elevati livelli di ossisteroli (**Penn M.S. and Chisolm G.M., 1994; Berliner J.A. and Heinecke J.W., 1996; Chisolm G.M. and Steinberg D., 2000; Gackowski D. et al., 2001; Witztum J.L. and Steinberg D., 2001; Gordiyenko N. et al., 2004**), e alcuni ossisteroli identificati nelle lesioni aterosclerotiche o che penetrano nelle cellule epiteliali pigmentate della retina (**Steinbrecher U.P. et al., 1990; Guardiola F. et al., 1996; Brown A.J. and Jessup W., 1999; Garcia-Cruset S. et al., 1999; Colles S.M. et al., 2001; Vaya J. et al., 2001**), sono rilevanti nell'induzione di processi ossidativi derivanti dalla sovrapproduzione di ROS. Questi ROS hanno effetti collaterali sostanziali sulle cellule della parete vascolare a vari stadi di sviluppo dell'aterosclerosi e sulle cellule retiniche e neuronali (**Berliner J.A. and Heinecke J.W., 1996; Garg T.K. and Chang J.Y., 2003; Vaya J. and Schipper H.M., 2007**). Infatti, contribuiscono a vari importanti eventi pro-aterosclerotici: proliferazione delle cellule muscolari lisce (**Greene E.L. et al., 2000**), maggiore accumulo di LDLox in macrofagi e cellule muscolari lisce e la conseguente formazione di cellule schiumose (**Berliner J.A. and Heinecke J.W., 1996**), perdita di reattività delle cellule endoteliali (**Touyz R.M., 2004**), perossidazione dei lipidi di membrana e accumulo di prodotti di ossidazione dei lipidi come malonildialdeide e ossisteroli, risultanti dall'ossidazione spontanea del colesterolo cellulare (**Hodis H.N. et al., 1992; Garcia-Cruset S. et al., 1999**), e induzione della morte cellulare (**Colles S.M. et al., 2001**).

Per quanto riguarda invece la malattia di Alzheimer, tutti e tre i prodotti di ossidazione del colesterolo implicati finora nella patogenesi di questa malattia, il 7 β -idrossicolesterolo, il 24-idrossicolesterolo e il 27-idrossicolesterolo, aumentano significativamente il legame della beta-amiloide (A β) alle cellule neuronali umane differenziate (SK-N-BE e NT-2), ma solo il 24-idrossicolesterolo, a concentrazioni fisiologiche, è in grado di potenziare notevolmente gli effetti pro-apoptotici e pro-necrogenici del peptide A β ₄₂ su queste cellule. Questo è dovuto

all'induzione di un forte aumento della generazione intracellulare di ROS NADPH ossidasi (NOX) dipendente e il conseguente danneggiamento dell'equilibrio redox delle cellule neuronali. L'incubazione delle cellule con gli antiossidanti quercetina o genisteina previene l'effetto pro-ossidante di questo ossisterolo e il potenziamento di necrosi e apoptosi indotte dall'A β (**Gamba P. et al., 2011**).

Sono stati effettuati numerosi studi *in vivo* e in particolare *in vitro* con diversi ossisteroli e miscele di ossisteroli, per valutare il loro effetto pro-ossidante in vari processi patologici (**Vejux A. and Lizard G., 2009**).

Per esempio, ratti alimentati con una dieta contenente ossisteroli hanno livelli significativamente più alti di mRNA della glutazione perossidasi e della superossido dismutasi, un'attività notevolmente maggiore della glutazione perossidasi e concentrazioni inferiori di glutazione totale e ridotto nel fegato rispetto ai ratti nutriti senza ossisteroli, suggerendo che gli ossisteroli alimentari sollecitano il sistema di difesa antiossidante (**Ringseis R. and Eder K., 2004**). In topi aterosclerotici apolipoproteina E-deficienti, è stato anche riportato che alcuni ossisteroli (7-chetocholesterolo, 7 β -idrossicolesterolo e 5 β ,6 β -epossicolesterolo) erano in grado di indurre l'attivazione della NOX dei macrofagi, il rilascio di acido arachidonico e la produzione di anione superossido, che contribuisce all'ossidazione cellulo-mediata delle LDL, e che la vitamina E era in grado di contrastare questi eventi (**Rosenblat M. and Aviram M., 2002**). Il trattamento con 7-chetocholesterolo, 7 β -idrossicolesterolo, 5 β ,6 β -epossicolesterolo, 5 α ,6 α -epossicolesterolo e 25-idrossicolesterolo, ha indotto un importante processo ossidativo, a volte associato ad una modalità complessa di morte cellulare con caratteristiche di apoptosi in vari tipi di cellule *in vitro* (**Pedruzzi E. et al., 2004; Lemaire-Ewing S. et al., 2005; Joffre C. et al., 2007; Roussi S. et al., 2007**). In cellule U937 trattate con 7-chetocholesterolo è stato riportato un forte calo di glutazione ridotto associato ad un aumento di attività della superossido dismutasi, che precede l'attivazione del processo apoptotico (**Lizard G. et al., 1998; O'Callaghan Y.C. et al., 2001; Ryan L. et al., 2004**). In cellule muscolari vascolari lisce di ratto trattate con colesten-3 β ,5 α ,6 β -triolo è stata descritta l'inibizione della glutazione perossidasi e dell'attività della superossido dismutasi, in relazione ad una modalità di morte cellulare apoptotica; è stata inoltre evidenziata la capacità delle selenoproteine di contrastare questi eventi (**Tang R. and Huang K., 2004; Tang R. et al., 2005**). In cellule muscolari lisce aortiche umane il 7-chetocholesterolo induce uno stress ossidativo associato ad eventi apoptotici ed è stato dimostrato che questo effetto è mediato da

una significativa sovraespressione (triplicata rispetto al livello basale) di NOX4, un omologo della NOX generatrice di ROS (**Pedruzzi E. et al., 2004**). Concentrazioni citotossiche di 7-chetocolesterolo e 7 β -idrossicolesterolo inducono anche processi di perossidazione lipidica e la diminuzione delle difese antiossidanti (**Lizard G. et al., 1998**). È interessante notare che alcuni antiossidanti (apigenina, astaxantina, carotene, folato, glutazione, licopene, N-acetilcisteina e vitamina E) sono in grado di prevenire la morte cellulare indotta dagli ossisteroli (**Lizard G. et al., 2000; Lee T. and Chau L., 2001; Miguet-Alfonsi C. et al., 2002; Huang R.F. et al., 2004; Palozza P. et al., 2007; Lordan S. et al., 2008**).

Miscele di ossisteroli in proporzioni “ateroma rilevanti” mostrano anche attività pro-ossidanti (**Vejux A. et al., 2008; Vejux A. and Lizard G., 2009**); in cellule U937, quando il 7 β -idrossicolesterolo è combinato con il 5 β ,6 β -epossicolesterolo, la diminuzione del livello di glutazione è significativamente maggiore rispetto al 7 β -idrossicolesterolo da solo (**O'Sullivan A J. et al., 2005**). Esperimenti successivi hanno mostrato che quando il 7-chetocolesterolo è stato somministrato alle cellule insieme al 7 β -idrossicolesterolo, la generazione di ROS in macrofagi murini J774.A1 era notevolmente attenuata (**Biasi F. et al., 2004**). È stato proposto che la competizione tra ossisteroli, apparentemente a livello di NOX, riduce l'induzione di ROS e la tossicità diretta che viene avviata da specifici ossisteroli (**Leonarduzzi G. et al., 2006**). Inoltre, nella linea cellulare di macrofagi murini J774.A1, con una miscela di ossisteroli biologicamente rappresentativa (7 α -idrossicolesterolo (10,2%), 7 β -idrossicolesterolo (6,7%), 5 α ,6 α -epossicolesterolo (10,3%), 5 β ,6 β -epossicolesterolo (24,3%), cholesten-3 β ,5 α ,6 β -triolo (10,0%), 7-chetocolesterolo (31,0%) e 25-idrossicolesterolo (7,3%)), che approssima le proporzioni di ossisteroli trovati nelle LDL dal plasma umano (**Sevanian A. et al., 1994**), il livello di mRNA della MnSOD è stato notevolmente aumentato dopo 24 ore di esposizione (**Yuan X.M. et al., 2000**). Questa sovraespressione di mRNA della MnSOD può essere una risposta adattativa importante degli ossisteroli per regolare le specie dell'ossigeno coinvolte nella morte apoptotica di macrofagi/cellule schiumose (**Vejux A. et al., 2008; Vejux A. and Lizard G., 2009**).

1.2.2 Ossisteroli e infiammazione

È ormai accettato che le aree vascolari di progressione aterosclerotica sono in uno stato di persistente infiammazione (**Witztum J.L. and Steinberg D., 2001; Tedgui A. and Mallat Z., 2006**). Tuttavia, il principale meccanismo attraverso il quale un eccesso cronico di colesterolo nel sangue contribuisca all'espressione di eventi infiammatori, che caratterizza l'insorgenza e/o la progressione dell'aterosclerosi, non è ancora stato chiaramente definito (**Vejux A. and Lizard G., 2009**).

Numerosi eventi ossidativi sono associati con lo sviluppo della placca aterosclerotica (**Cave A.C. et al., 2006**) ed è ora accertato che le oxLDLs svolgono un ruolo importante nella iniziazione e promozione di strie lipidiche e placche fibrotiche (**Berliner J.A. and Heinecke J.W., 1996**). Fra gli agenti ossidanti presenti nelle oxLDLs che possono essere responsabili dei processi infiammatori, diversi ossisteroli sono di interesse primario (**Lemaire-Ewing S. et al., 2005**). Quando monociti umani, macrofagi derivati da monociti (cellule THP-1) e cellule dell'epitelio pigmentato retinico suino sono stati esposti ad una serie di ossisteroli (7-chetocolesterolo, 7 β -idrossicolesterolo, 24-idrossicolesterolo, 25-idrossicolesterolo o colesteno-3 β ,5 α ,6 β -triolo), tutti hanno stimolato la produzione di IL-8, ma il 25-idrossicolesterolo è stato il più potente (**Liu Y. et al., 1997; Joffre C. et al., 2007**). In cellule mononucleate umane l'attività pro-infiammatoria del 25-idrossicolesterolo è aumentata in condizioni di ipossia (**Rydberg E.K. et al., 2003**); questo ossisterolo si è rivelato anche capace di potenziare la secrezione di IL-1 β indotta da LPS (**Rosklint T. et al., 2002**). Inoltre, in cellule leucemiche umane promonocitiche (U937) e nella linea cellulare macrofagica murina J774-A1, una miscela di ossisteroli biologicamente rappresentativa (7 α -idrossicolesterolo (5%), 7 β -idrossicolesterolo (10%), 5 α ,6 α -epossicolesterolo (20%), 5 β ,6 β -epossicolesterolo (20%), colesteno-3 β ,5 α ,6 β -triolo (9%), 7-chetocolesterolo (35%) e 25-idrossicolesterolo (1%)) ha indotto sia l'espressione che la sintesi di chemochine chiave per monociti/macrofagi, in particolare la proteina chemiotattica dei monociti 1 (MCP-1) (**Leonarduzzi G. et al., 2005**), e ha aumentato l'espressione del fattore di crescita β 1 (TGF- β 1), svolgendo così un ruolo fondamentale nella chemiotassi delle cellule muscolari lisce e nel differenziamento in strutture miofibroblasto-simili (**Leonarduzzi G. et al., 2001**). È stata inoltre riportata, in cellule U937 e THP-1, una stimolazione della secrezione di varie chemochine coinvolte nel reclutamento di cellule immunocompetenti a livello

sottoendoteliale, ossia MCP-1, MIP-1, proteina infiammatoria dei monociti 1 β (MIP-1 β), fattore di necrosi tumorale α (TNF- α), IL-1 β e IL-8, principalmente in presenza di 7 β -idrossicolesterolo e 25-idrossicolesterolo (**Lizard G. et al., 1997; Prunet C. et al., 2006**). Inoltre, in cellule endoteliali della vena ombelicale umana (HUVECs), il 7 α -idrossicolesterolo, il 7 β -idrossicolesterolo, il 7-cetocolesterolo e il 25-idrossicolesterolo migliorano anche l'espressione di molecole di adesione coinvolte nel reclutamento di cellule immunocompetenti come molecole di adesione intracellulare 1 (ICAM-1), molecole di adesione delle cellule vascolari-1 (VCAM-1) ed E-selectine (**Lemaire S. et al., 1998; Naito Y. et al., 2004**). Il trattamento di cellule muscolari lisce aortiche di ratto con il 25-idrossicolesterolo o il 22R-idrossicolesterolo provoca l'accumulo di PLA₂ secretoria di gruppo IIA e aumenta l'attività enzimatica (**Antonio V. et al., 2003**). In accordo con queste osservazioni, la sostanziale stimolazione della produzione di eicosanoidi è stata osservata in cellule ovariche di criceto CHO-K1 e cellule endoteliali dell'arteria coronarica bovina trattate con il 25-idrossicolesterolo (**Wohlfeil E.R. and Campbell W.B., 1997; Panini S.R. et al., 2001**).

Al momento, poco si sa sui meccanismi molecolari coinvolti nel processo infiammatorio indotto dagli ossisteroli a livello trascrizionale, e sono probabilmente coinvolte diverse modalità di regolazione dell'espressione genica, dato che l'attivazione dei recettori LXR avviene solo con alcuni ossisteroli pro-infiammatori, ovvero il 22R-idrossicolesterolo e il 25-idrossicolesterolo, ma non con il 7 β -idrossicolesterolo (**Peet D.J. et al., 1998; Edwards P.A. et al., 2002; Khan S.A. and Vanden Heuvel J.P., 2003**). Allo stesso modo, sono disponibili poche informazioni sulle vie metaboliche attivate dagli ossisteroli a livello traduzionale e post-traduzionale. Tuttavia, in cellule U937 e THP-1 trattate con 7 β -idrossicolesterolo, è stato chiaramente dimostrato che la secrezione di IL-8 era associata con l'attivazione della via di segnalazione MEK/ERK1/2 (**Prunet C. et al., 2006**). È interessante notare che, in presenza di un potente inibitore di MEK, la secrezione di IL-8 è stata totalmente contrastata, mentre non è stata osservata una diminuzione del livello di mRNA o di IL-8 intracellulare (**Prunet C. et al., 2006**).

1.2.3 Ossisteroli a livello intestinale

L'intestino e il fegato rappresentano i siti iniziali di esposizione agli ossisteroli alimentari (O'Sullivan A.J. et al., 2003). È stata recentemente suggerita un'associazione di questi composti con lo sviluppo delle IBD, come la CU e il MC (Biasi F. et al., 2007; Mascia C. et al., 2010; Biasi F. et al., 2013a), e con un aumento del rischio di sviluppare il cancro colon retinale (Jusakul A. et al., 2011; Biasi F. et al., 2013a) e altri tipi di tumore con sede gastrointestinale (Jusakul A. et al., 2011).

Gli ossisteroli sono in grado di indurre l'espressione e la sintesi della citochina TGF- β 1, evento che può essere dannoso o benefico a seconda della sua effettiva intensità. Il TGF- β 1, normalmente espresso nelle cellule endoteliali, è fondamentale per il mantenimento dell'omeostasi delle cellule dell'epitelio intestinale attraverso il controllo della proliferazione e del differenziamento cellulare, nonché dell'apoptosi, e la sua disregolazione è stata osservata in diverse malattie croniche umane, comprese la CU, il MC e il carcinoma del colon (Biasi F. et al., 2007).

Come riportato per molti tumori umani, tra cui il cancro del colon, le cellule neoplastiche tendono a diventare meno suscettibili agli effetti regolatori sulla crescita del TGF- β 1, soprattutto a causa della ridotta espressione e/o attività dei recettori specifici (TGF- β 1 I e II). Di conseguenza, un aumento sostenuto di TGF- β 1 nella mucosa intestinale, come quello causato da processi infiammatori e/o un'elevata assunzione di grassi animali con la dieta, potrebbe diventare fondamentale per la progressione di un clone neoplastico. Infatti, questa citochina pro-apoptotica e pro-differenziante, fondamentale nella regolazione della crescita delle cellule dell'epitelio intestinale, potrebbe eliminare le cellule neoplastiche ancora suscettibili all'azione antiproliferativa del TGF- β 1 (cellule TGF- β 1 recettore-positive), favorendo indirettamente l'espansione clonale di quelle TGF- β 1 resistenti (cellule TGF- β 1 recettori carenti o negative).

I principali prodotti di ossidazione dei grassi animali, tra cui gli ossisteroli, possono favorire l'espansione clonale delle cellule epiteliali del colon TGF- β 1 recettore deficienti/negative, attraverso l'aumento dell'espressione del TGF- β 1 e di altre molecole di trasduzione nei macrofagi e nei fibroblasti, che circondano la lesione neoplastica. Il risultato è una presenza costante di concentrazioni relativamente elevate di TGF- β 1 e di altri fattori modulatori della crescita nell'area della proliferazione neoplastica. Non c'è alcun dubbio che il livello e

l'attività del TGF- β 1 possono essere sovraregolati in cellule della linea macrofagica dai prodotti di ossidazione dei grassi animali, come ossisteroli e aldeidi. Ma i fagociti nonché i fibroblasti esprimono costitutivamente il TGF- β 1 e si accumulano nello stroma associato al tumore. Quindi la sovraregolazione di questa citochina nello stroma del colon associato al tumore attraverso un'eccessiva assunzione di colesterolo e PUFA n-6 appare come meccanismo primario della progressione del cancro, almeno in lesioni neoplastiche del tratto digestivo **(Biasi F. et al., 2008)**.

Diversi studi sono stati effettuati su un modello di epitelio intestinale umano che utilizza la linea cellulare Caco-2. Sebbene le cellule Caco-2 siano cellule di adenocarcinoma del colon, esse vanno incontro spontaneamente a differenziazione in cellule enterocita-simili circa 21 giorni dopo la semina su piastra. Le cellule Caco-2 differenziate esprimono i microvilli, le membrane basolaterali separate da giunzioni strette e gli enzimi intestino-specifici, inoltre, mostrano proprietà assorbenti simili a quelle di un normale intestino **(Biasi F. et al., 2009)**.

Una miscela di ossisteroli rappresentativa di quanto può essere ingerito con la dieta **(Biasi F. et al., 2009; Mascia C. et al., 2010; Biasi F. et al., 2013a)**, contenente 7- β -chetocolesterolo (42,96%), 5 α ,6 α -epossicolesterolo (32,3%), 5 β ,6 β -epossicolesterolo (5,76%), 7 α -idrossicolesterolo (4,26%) e 7 β -idrossicolesterolo (14,71%) **(Plat J. et al., 2005)**, utilizzata alle concentrazioni 30 e 60 μ M per trattare cellule Caco-2 indifferenziate e differenziate, non ha esercitato alcun effetto necrogenico in entrambi i tipi cellulari e ha mostrato un significativo effetto pro-apoptotico solo nelle cellule differenziate. Il pathway mitocondriale di morte cellulare programmata è apparso sovraregolato nelle cellule Caco-2 differenziate in seguito al trattamento con gli ossisteroli, come mostrato dalla diminuzione netta del potenziale mitocondriale, seguito dal rilascio del citocromo c nel citosol e dall'attivazione della caspasi-3. In particolare, l'evento chiave nella sovraregolazione della morte programmata indotta dagli ossisteroli nelle cellule Caco-2 differenziate è stato una maggiore produzione di specie reattive dell'ossigeno, conseguente alla marcata attivazione della NOX colonica (NOX1). Infatti, la depolarizzazione mitocondriale e l'attivazione della caspasi-3 indotta dagli ossisteroli nelle cellule Caco-2 differenziate sono state impedito dall'inibizione dell'attività di NOX mediante l'utilizzo di un inibitore specifico, il Diphenyleneiodonium (DPI). Questo conferma un'associazione causale dell'effetto pro-ossidante e proapoptotico nelle cellule del colon **(Biasi F. et al., 2009)**. Recentemente, è stato anche analizzato e descritto il probabile ruolo della NOX fagocitaria (NOX2), così come quello delle isoforme

altamente espresse nella mucosa gastrointestinale (NOX1 e DUOX2), nella patogenesi delle IBD e nella carcinogenesi al colon (**Rokutan K. et al., 2008**).

La medesima miscela di ossisteroli utilizzata ad una concentrazione di 30 μM nelle cellule Caco-2 differenziate, sovraregola l'espressione e la sintesi dell'IL-8. Questa è una delle più importanti citochine coinvolte nell'infiammazione intestinale, è chemiotattica e promuove la migrazione dei neutrofili nello strato epiteliale. La miscela esercita un effetto colitico attraverso la sovraregolazione della NOX1. L'induzione dell'IL-8 nelle Caco-2 da parte della miscela è stata prevenuta dal pretrattamento delle cellule con il DPI. Quando i vari ossisteroli che compongono la miscela sono stati aggiunti singolarmente, nelle stesse concentrazioni a cui sono presenti nella miscela, il 7 β -idrossicolesterolo ha aumentato notevolmente l'espressione e la sintesi dell'IL-8 in modo più efficiente rispetto alla miscela di ossisteroli, mentre gli altri componenti hanno avuto poco o nessun effetto su questa citochina. Quando il 7 β -idrossicolesterolo è stato aggiunto in coppia con ognuno degli altri ossisteroli presenti nella miscela, tre dei quattro ossisteroli (7-chetocolesterolo, 5 α ,6 α -epossicolesterolo e 5 β ,6 β -epossicolesterolo) hanno modulato leggermente la sovraregolazione esercitata dal 7 β -idrossicolesterolo sull'IL-8 mentre il 7 α -idrossicolesterolo non ha avuto effetto; solo il trattamento combinato 5 β ,6 β -epossicolesterolo e 7 β -idrossicolesterolo ha indotto livelli di mRNA per l'IL-8 e di proteina simili a quelli raggiunti nelle cellule trattate con la miscela. Inoltre, la miscela di ossisteroli ha sovraregolato l'espressione di altre interleuchine pro-infiammatorie, IL-1 α , IL-6, MCP-1 e IL-23 e ha incrementato i livelli cellulari di mRNA del TGF β 1 e di due recettori di membrana coinvolti nella modulazione dell'immunità intestinale innata, TLR2 e TLR9. Il 7 β -idrossicolesterolo ha indotto un incremento dell'espressione di tutte le molecole indotte dalla miscela, tranne i TLR 2 e 9; inoltre l'effetto sulle citochine pro-infiammatorie, IL-1 α , IL-6, MCP-1 e IL-23 è sembrato più marcato rispetto a quello della miscela (**Mascia C. et al., 2010**).

Quando diverse concentrazioni (30, 60 e 90 μM) della miscela di ossisteroli o gli ossisteroli aggiunti singolarmente alle stesse concentrazioni a cui sono presenti nella miscela 60 μM sono state utilizzate per trattare cellule Caco-2 indifferenziate, le concentrazioni 30 e 60 μM della miscela non hanno esplicitato alcun effetto necrogenico, che si è invece osservato con 90 μM ; successivamente è stata quindi utilizzata la miscela 60 μM o i singoli ossisteroli. La miscela 60 μM ha mostrato un lieve effetto pro-apoptotico, valutato in termini di attivazione della caspasi-3 e della caspasi-7; mentre il 7 α -idrossicolesterolo, il 7 β -idrossicolesterolo e il

5 α ,6 α -epossicolesterolo sono risultati in grado di indurre un aumento dell'attività delle caspasi-3 e 7, quindi un significativo effetto pro-apoptotico, se aggiunti alla coltura cellulare singolarmente. Il 7 β -idrossicolesterolo ha esplicato un'azione maggiore rispetto agli altri ossisteroli e alla miscela. L'aumento della produzione di specie reattive dell'ossigeno attraverso la sovraregolazione dell'isoforma NOX1 sembra essere l'evento chiave nell'apoptosi indotta dagli ossisteroli in queste cellule. Il trattamento con la miscela ha indotto una lieve ma significativa differenza nell'induzione della NOX1 rispetto al controllo e il 5 α ,6 α -epossicolesterolo e il 7 β -idrossicolesterolo sono stati ancora più efficienti della miscela nell'induzione dell'attività della NOX1. Quando le cellule sono state trattate con l'inibitore della NOX, il DPI, non si è osservata attivazione della NOX1 né attivazione delle caspasi-3 e 7. Per quanto riguarda gli effetti pro-infiammatori degli ossisteroli è stata valutata la sintesi delle citochine IL-8 e MCP-1. Si è osservato un lieve incremento di IL-8 solo in seguito al trattamento con la miscela, mentre la produzione di MCP-1 è stata significativamente indotta dal 7 β -idrossicolesterolo e, in misura minore, dalla miscela di ossisteroli. L'infiammazione indotta dagli ossisteroli sembra essere NOX1-indipendente, infatti in presenza di DPI non si osserva inibizione di MCP-1 suggerendo un ruolo secondario di questo enzima nell'infiammazione indotta dagli ossisteroli nelle cellule tumorali del colon.

Questi risultati indicano un ruolo selettivo di alcuni componenti della miscela di ossisteroli nell'induzione dell'apoptosi in cellule tumorali del colon, principalmente attraverso la generazione di ROS NOX1-dipendente. Al contrario, la parziale risposta di queste cellule tumorali a stimoli infiammatori indotta da ossisteroli, principalmente il 7 β -idrossicolesterolo, sembra essere NOX1-indipendente (**Biasi F. et al., 2013a**).

Per quanto riguarda l'attività pro-infiammatoria di alcuni ossisteroli nelle cellule intestinali, Bai e collaboratori hanno dimostrato che in cellule Caco-2 indifferenziate, il pretrattamento con il 25-idrossicolesterolo aumenta significativamente la produzione dell'IL-8, sia a livello di espressione dell'mRNA che di secrezione della proteina, solo dopo stimolazione con IL-1 β . L'IL-1 β , un importante mediatore dell'infiammazione intestinale, promuove la produzione di IL-8, che può essere modulata da una serie di fattori, incluso lo stress ossidativo. Inoltre, il pretrattamento con il 25-idrossicolesterolo, seguito dalla stimolazione con IL-1 β , ha aumentato l'attività del promotore dell'IL-8 rispetto a quella osservata solo con IL-1 β . Questi risultati suggeriscono che il 25-idrossicolesterolo aumenti la produzione di IL-8 indotta dall'IL-1 β , probabilmente regolando l'attività del promotore (**Bai B. et al., 2005**).

Quattro ossisteroli che si trovano comunemente nella dieta, il 25-idrossicolesterolo, il 7 β -idrossicolesterolo, il 5 β ,6 β -epossicolesterolo e il 5 α ,6 α -epossicolesterolo, hanno esplicito un effetto citotossico in cellule Caco-2 indifferenziate (**O'Sullivan A.J. et al., 2003**). Inoltre, in cellule Caco-2 incubate 24 ore con diversi ossisteroli (30 μ M), il 5 α ,6 α -epossicolesterolo non ha indotto una riduzione significativa della vitalità cellulare, il 5 β ,6 β -epossicolesterolo, il 7 β -idrossicolesterolo e il 7-chetocolesterolo hanno causato una significativa riduzione della vitalità mentre il colest-3 β ,5 α ,6 β -triolo, che è risultato il più tossico, ha causato una considerevole riduzione della vitalità (**Ryan E. et al., 2005**).

Per quanto riguarda l'effetto antiproliferativo del 7 β -idrossicolesterolo, il trattamento con una concentrazione 30 μ M è stato in grado di indurre l'inibizione della crescita in cellule Caco-2 indifferenziate. Il 7 β -idrossicolesterolo, non ha alterato il ciclo cellulare, non ha attivato le caspasi-3 e 8 ma è stato osservato un significativo aumento dell'attività della caspasi-9 e la frammentazione del DNA. Il trattamento con un inibitore della caspasi (Z-VAD.fmk) non ha ritardato il processo apoptotico indotto dal 7 β -idrossicolesterolo. Questi risultati suggeriscono che il 7 β -idrossicolesterolo induce morte cellulare nelle Caco-2 secondo un meccanismo non mediato dalle caspasi (**Roussi S. et al., 2005**). In uno studio successivo, lo stesso gruppo di ricerca ha dimostrato che il 7 β -idrossicolesterolo induceva la morte cellulare potenziando la perdita di potenziale di membrana mitocondriale, un processo che è indipendente dalle proteine Bcl-2/Bax. Inoltre ha comportato il rilascio di citocromo c e un *pathway* di morte caspasi-indipendente che coinvolge la produzione di ROS e la stimolazione dell'espressione dell'endonucleasi G. Inoltre ha alterato l'integrità della membrana lisosomiale (**Roussi S. et al., 2007**).

Per quanto riguarda invece il 7-chetocolesterolo, la sua citotossicità è stata valutata utilizzando differenti concentrazioni (0-120 μ M) e tempi di incubazione (4-24 ore) in cellule Caco-2, utilizzate 6 giorni dopo la semina. L'attività endo/lisosomiale non è stata compromessa. Il 7-chetocolesterolo ha mostrato un effetto deleterio sul compartimento mitocondriale alterando il potenziale di membrana a tutte le concentrazioni testate (12/24 ore). Inoltre il 7-chetocolesterolo non ha alterato il ciclo cellulare. Le cellule incubate con 30 e 60 μ M di 7-chetocolesterolo mostrano un trend in aumento per l'RNA totale nella popolazione in fase G1 e un trend in diminuzione del contenuto di RNA totale nella popolazione in fase G2, mentre le cellule incubate con 120 μ M di 7-chetocolesterolo hanno mostrato una diminuzione del contenuto di RNA nella popolazione G1. Questo riflette gli effetti negativi di

questo composto sulla principale popolazione cellulare funzionale, in cui altera la sintesi proteica (**Alemaný L. et al., 2012**).

1.3 Tossicità degli ossisteroli: modulazione della NADPH ossidasi e delle MAPKs

1.3.1 NADPH ossidasi (NOX)

È stato dimostrato che i ROS, tra cui il perossido di idrogeno (H_2O_2), il radicale idrossile ($OH\bullet$), l'ossigeno singoletto (1O_2), il perossinitrito ($ONOO^-$) e il superossido ($O_2^{\bullet-}$) agiscono come molecole segnale che modulano molteplici risposte cellulari (**Katsuyama M., 2010**).

Le principali fonti di $O_2^{\bullet-}$ generato nell'organismo sono le NOX. Queste ossidasi producono $O_2^{\bullet-}$ dall'ossigeno usando il NADPH come donatore di elettroni (**Katsuyama M., 2010**). La famiglia delle NOX è la sola famiglia di enzimi conosciuta con l'unica funzione di produrre ROS (**Altenhofer S. et al., 2012**).

Quindi la NOX è un enzima che genera superossido (O_2^-), identificato per la prima volta nei fagociti, che mostra attività battericide (**Katsuyama M., 2010**).

Gli studi sulle NOX sono stati effettuati prevalentemente nei fagociti, come i neutrofili, perché mutazioni nei geni che codificano per la NOX fagocitica sono state trovate in pazienti affetti da malattia granulomatosa cronica (**Royer-Pokora B. et al., 1986**). La NOX fagocitica è costituita da due proteine di membrana, gp91phox o NOX2 e p22phox; tre proteine citosoliche, p67phox, p47phox e p40phox, e una piccola proteina Rac legante il GTP. NOX2 è la subunità catalitica di questo enzima. Un'infezione batterica induce l'associazione e la traslocazione sulla membrana del fagosoma dei componenti citosolici e comporta l'attivazione di questo enzima (**Katsuyama M., 2010**).

D'altra parte, è stato riportato che l' $O_2^{\bullet-}$ viene prodotto in maniera NADPH dipendente anche in cellule non fagocitiche come le cellule muscolari lisce vascolari (VSMC) o le cellule epiteliali gastrointestinali. Il fatto che la NOX2 non venga espressa in queste cellule ha suggerito la presenza di enzimi omologhi (**Katsuyama M., 2010**). L'identificazione di un omologo di NOX2 altamente espresso nelle cellule epiteliali del colon è stata riportata da Suh e colleghi nel 1999 (**Suh Y.A. et al., 1999**) e da Banfi e colleghi nel 2000 (**Banfi B. et al., 2000**). Questo omologo, che è stato chiamato NOX1 (**Katsuyama M., 2010**), è presente in abbondanza nel colon e a livelli inferiori nell'utero, nella prostata e nelle cellule muscolari lisce vascolari (**Suh Y.A. et al., 1999**). Per quanto riguarda la localizzazione subcellulare di NOX1, questa si trova nelle caveole, introflessioni a forma di fiasca della membrana

plasmatica coinvolte nel trasporto di molecole di dimensioni non troppo elevate e di ioni all'interno delle cellule, o negli endosomi precoci (**Hilenski L.L. et al., 2004; Miller F.J., Jr. et al., 2007**).

Finora, sono state identificate cinque isoforme di NOX (NOX1, NOX2, NOX3, NOX4 e NOX5) e due enzimi correlati, DUOX1 e DUOX2 (**Katsuyama M., 2010; Altenhofer S. et al., 2012; Natarajan S.K. and Becker D.F., 2012**). Le varie isoforme hanno caratteristiche diverse in dipendenza delle componenti necessarie per l'attivazione, della distribuzione tissutale, della regolazione dell'espressione e delle funzioni fisiologiche (**Katsuyama M., 2010**).

I ROS generati dalle NOX sono coinvolti nello stress ossidativo e nel “*signaling*”. Originariamente l'unica funzione fisiologica attribuita alla NOX era quella di essere responsabile del “burst” respiratorio del fagocita per uccidere i microrganismi invasori. In seguito all'attivazione, la NOX2 genera una grande quantità di superossido nei neutrofili che porta all'uccisione dei microbi durante la fagocitosi. Con la scoperta di diverse isoforme della NOX sono emerse ulteriori funzioni cellulari, oltre a quella di difesa dell'ospite. Le NOX, infatti, partecipano al “redox signaling” che coinvolge l'attivazione mediata dal perossido d'idrogeno di differenti “pathways” che regolano la proliferazione e la morte cellulare (**Natarajan S.K. and Becker D.F., 2012**).

Inizialmente la NOX1 è stata isolata dalle cellule epiteliali del colon (**Suh Y.A. et al., 1999; Banfi B. et al., 2000**) ma è espressa anche nelle cellule muscolari vascolari lisce dove si pensa che sia coinvolta nella proliferazione e nell'ipertrofia (**Suh Y.A. et al., 1999; Lassegue B. et al., 2001**). Nonostante il livello di espressione di NOX1 nelle cellule muscolari vascolari lisce venga incrementato dalla stimolazione con angiotensina II, PDGF, prostaglandina F_{2α}, siero o TPA, il livello è estremamente basso rispetto a quello nelle cellule epiteliali del colon (**Lassegue B. et al., 2001; Katsuyama M. et al., 2002; Fan C. et al., 2008**).

L'espressione di NOX1 è stata riportata anche in macrofagi (**Lee S.H. et al., 2009**) e mastociti (**Kim G.Y. et al., 2010**). È stato suggerito che in queste cellule la NOX1 sia coinvolta rispettivamente nella formazione di cellule schiumose e nella secrezione di IL-8 indotta dall'IL-1β contribuendo all'angiogenesi (**Katsuyama M., 2010**).

Il livello di espressione di NOX1 nel colon è molto elevato rispetto ad altri organi (**Suh Y.A. et al., 1999; Banfi B. et al., 2000**). Il ruolo fisiologico della NOX1 nel colon rimane alquanto controverso. Sono stati proposti due ruoli, nella difesa immunitaria e nella proliferazione

cellulare, o in condizioni patologiche, nelle IBD e nella carcinogenesi (**Rokutan K. et al., 2006; Rokutan K. et al., 2008**).

L'attivazione della NOX1 costituisce una risposta precoce nella difesa delle cellule epiteliali dell'ospite contro gli agenti patogeni (**Grandvaux N. et al., 2007**).

È stato suggerito che sia coinvolta nella proliferazione cellulare e nella differenziazione post-mitotica, attraverso il controllo dell'equilibrio tra cellule calciformi e assorbenti (**Coant N. et al., 2010**). È stato dimostrato che la produzione di ROS da parte della NOX1 viene incrementata in risposta a LPS e flagellina (**Kawahara T. et al., 2004**). Diversi studi hanno correlato l'aumento dell'attività della NOX1 all'aumento dei processi di segnalazione proliferativi come l'attivazione delle protein chinasi attivate da mitogeni (MAPKs) (**Adachi Y. et al., 2008**) e c-Src (**Gianni D. et al., 2008**). Un altro studio recente suggerisce che l'aumento dell'attività della NOX1 promuove la migrazione delle cellule dell'adenocarcinoma del colon (**Sadok A. et al., 2008**).

È stato proposto che la sua iperattivazione potrebbe avere un ruolo importante nell'infiammazione del colon e nell'oncogenesi (**Rokutan K. et al., 2008**).

Come NOX2, NOX1 richiede vari componenti per la sua attività enzimatica (**Katsuyama M., 2010**). Nell'intestino la NOX consiste di due componenti legati alla membrana, NOX1 (subunità omologa della gp91^{phox} fagocitica) e p22^{phox}, tre subunità citosoliche, NoxA1 (subunità omologa della p67^{phox} fagocitica), p40^{phox} e NoxO1 (subunità omologa della p47^{phox} fagocitica), più una piccola GTPasi, Rac. Durante l'attivazione della NOX i suoi componenti citoplasmatici NoxA1 e p40^{phox} vengono fosforilati e NoxO1 li unisce al complesso flavocitocromo attivo NOX1 e p22^{phox} di membrana (**Biasi F. et al., 2009**).

Diversi studi hanno dimostrato che in diversi tipi cellulari stimoli quali TNF- α , angiotensina II, trombina e PDGF sono in grado di stimolare la produzione di ROS da parte della NOX1 e quindi di indurre attraverso l'attivazione di vie di segnalazione quali JNK, p38, SSH1L, c-Src ed ERK 1/2, eventi cellulari quali la morte, l'ipertrofia, la migrazione o la crescita (**Brown D.I. and Griendling K.K., 2009**).

È stato inoltre dimostrato che in cellule intestinali umane HT-29 e Caco-2 anche l'azione pro-infiammatoria di alcuni agenti tossici si sviluppa attraverso l'attivazione della NOX, con conseguente produzione di ROS, attivazione delle MAPKs p38 ed ERK1/2 e di NF- κ B e produzione di IL-8 (**Kuntz S. et al., 2010**).

D'altro canto citochine pro-infiammatorie possono seguire un percorso inverso. In cellule di tumore coloretale umano HT-29.19A l'IL-13 può stimolare la produzione di ROS attraverso l'attivazione IL-13R α 1-JAK1-STAT6- e IL-13R α 2-MEK1/2-ERK1-2-dipendente della NOX1 (**Mandal D. et al., 2010**) e in cellule di cancro al colon T84, il TNF- α , attraverso l'attivazione delle vie di segnalazione come p38 e JNK attiva la NOX1 (**Kuwano Y. et al., 2008**).

1.3.2 MAPKs

Le MAPKs (mitogen-activated protein kinases) sono proteine serina/treonina chinasi che convertono gli stimoli extracellulari in un'ampia gamma di risposte cellulari (**Cargnello M. and Roux P.P., 2011**). Le MAPKs sono tra le più antiche vie di trasduzione del segnale e sono state ampiamente utilizzate nel corso dell'evoluzione in molti processi fisiologici (**Widmann C. et al., 1999**). Tutte le cellule eucariotiche possiedono molteplici vie MAPKs, che coordinatamente regolano l'espressione genica, la mitosi, il metabolismo, la motilità, la sopravvivenza, l'apoptosi e il differenziamento (**Cargnello M. and Roux P.P., 2011**). La maggioranza di queste sono, insieme alla via del fattore nucleare-kB (NF-kB), reclutate da stress e stimoli infiammatori (**Kyriakis J.M. and Avruch J., 2012**).

Nei mammiferi, sono state caratterizzate 14 MAPKs suddivise in sette gruppi. Le MAPKs convenzionali comprendono ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinases 1/2*), JNK1/2/3 (*c-Jun amino (N)-terminal kinases 1/2/3*), le isoforme di p38 (α , β , γ e δ) ed ERK5, mentre le MAPKs atipiche comprendono ERK3/4, ERK7 ed NLK (*Nemo-like kinase*). I gruppi di gran lunga più studiati di MAPKs di mammifero sono ERK1/2, JNKs e le isoforme di p38 (**Cargnello M. and Roux P.P., 2011**).

Questo gruppo di MAPKs convenzionali è composto da un insieme di tre chinasi, conservate evolutivamente, che agiscono in sequenza: una MAPK, una MAPK chinasi (MAPKK) e una MAPKK chinasi (MAPKKK). Le MAPKKKs, che sono proteine serina/treonina chinasi sono spesso attivate attraverso la fosforilazione e/o in seguito alla loro interazione con una proteina legante il GTP della famiglia Ras/Rho in risposta a stimoli extracellulari. L'attivazione della MAPKKK porta alla fosforilazione e attivazione di una MAPKK che poi stimola l'attività della MAPK attraverso una doppia fosforilazione sui residui di treonina e tirosina. La fosforilazione di questi residui è essenziale per le attività enzimatiche (**Cargnello M. and Roux P.P., 2011**).

1.3.2.1 ERK - interazione con gli ossisteroli

ERK1 è stata la prima MAPK di mammifero a essere clonata e caratterizzata (**Cargnello M. and Roux P.P., 2011**). ERK1 ed ERK2 vengono espresse in diversa misura in tutti i tessuti con livelli particolarmente elevati in cervello, muscolo scheletrico, timo e cuore (**Boulton T.G. et al., 1990**). ERK1 ed ERK2 vengono attivate da fattori di crescita compreso il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF), il fattore di crescita dell'epidermide (EGF) e il fattore di crescita della cellula nervosa (NGF), e in risposta all'insulina (**Boulton T.G. et al., 1990**). Sono anche attivate da ligandi per recettori eterotrimerici accoppiati a proteine G (GPCRs), citochine, stress osmotico e disorganizzazione dei microtubuli (**Raman M. et al., 2007**).

Nelle cellule quiescenti ERK1/2 ha una localizzazione citoplasmatica, ma al momento della stimolazione extracellulare, una percentuale significativa di ERK1/2 si accumula nel nucleo (**Chen R.H. et al., 1992; Lenormand P. et al., 1993**).

ERK1/2 gioca un ruolo centrale nel controllo della proliferazione cellulare. L'attività di ERK1/2 è rapidamente stimolata da agenti mitogenici e, in cellule normali l'attivazione sostenuta di queste chinasi è richiesta per un'efficiente progressione dalla fase G₁ alla fase S. ERK1/2 controlla la proliferazione cellulare attraverso diversi meccanismi che includono l'induzione di regolatori positivi del ciclo cellulare (**Meloche S. and Pouyssegur J., 2007**).

ERK1 e 2 possono anche essere coinvolte nella risposta allo stress ossidativo che porta alla proliferazione o all'apoptosi (**Stanciu M. et al., 2000; Seo S.R. et al., 2001; Noshita N. et al., 2002; Canals S. et al., 2003; Kabe Y. et al., 2005**). ERK gioca un doppio ruolo nella regolazione della morte cellulare e della sopravvivenza che dipende dalla forza e dalla durata della sua attivazione: un'attivazione persistente di ERK porta alla morte cellulare (**Stanciu M. et al., 2000; Seo S.R. et al., 2001; Canals S. et al., 2003**) (**Watabe M. et al., 1997; van den Brink M.R. et al., 1999**), mentre un'attivazione di breve durata è associata alla sopravvivenza (**Xia Z. et al., 1995**).

È stato dimostrato che ERK è coinvolta in diversi eventi correlati con l'induzione dell'aterosclerosi da parte degli ossisteroli.

È stato infatti osservato che attraverso una prolungata attivazione di ERK e l'attivazione di NF-kB, probabilmente in risposta allo stress ossidativo e/o all'incremento della concentrazione del calcio intracellulare, il colestano-3 β ,5 α ,6 β -triolo ha indotto l'apoptosi delle cellule

endoteliali della vena ombelicale umana (ECV-304); l'apoptosi delle cellule endoteliali vascolari è stata strettamente associata allo sviluppo dell'aterosclerosi (**Liu H. et al., 2011**).

Inoltre, l'attivazione di ERK1/2 mediata dal calcio, ha preceduto i cambiamenti ultrastrutturali, disorganizzazione del reticolo endoplasmatico e delle membrane del Golgi, che hanno caratterizzato la morte cellulare indotta nelle cellule muscolari lisce aortiche umane dal 7 β -idrossicolesterolo, che può trovarsi nelle oxLDLs (**Ares M.P.S. et al., 2000**).

ERK è coinvolta anche nell'induzione da parte degli ossisteroli del differenziamento cellulare monocitico e nella formazione di cellule schiumose che si verifica nelle lesioni vascolari durante la progressione dell'aterosclerosi. È stato dimostrato che in cellule promonocitiche umane (U937) una miscela di ossisteroli biologicamente rappresentativa stimola l'espressione e la sintesi del recettore CD36, marker di macrofagi maturi e recettore chiave per la captazione e l'accumulo delle oxLDLs. In questa via di segnalazione è stato evidenziato il coinvolgimento della proteina chinasi C δ (PKC δ), seguito da un'aumentata regolazione delle chinasi MEK/ERK1/2 e del recettore attivato dai PPAR γ (**Leonarduzzi G. et al., 2008**).

Gli ossisteroli trovati nelle oxLDLs sono probabilmente coinvolti nella comparsa di ateromi, in quanto citotossici e/o in grado di indurre la secrezione di citochine. È stato dimostrato che ERK è implicata nell'induzione della secrezione di IL-8 da parte del 7 β -idrossicolesterolo e del 25-idrossicolesterolo in cellule monocitiche (THP-1).

È stato osservato, infatti, che la secrezione di IL-8 indotta dagli ossisteroli è un fenomeno calcio-dipendente che coinvolge il pathway MEK/ERK1/2 che porta, attraverso la proteina attivatrice-1 (AP-1), l'incremento dell'mRNA e/o l'attivazione di c-fos, all'attivazione del gene IL-8 (**Lemaire-Ewing S. et al., 2009**).

Sempre attraverso la via di segnalazione MEK/ERK1/2, il 25-idrossicolesterolo, un potenziale induttore di reazioni infiammatorie coinvolte nello sviluppo della degenerazione maculare legata all'età (ARMD), induce la secrezione di IL-8 anche in cellule di epitelio pigmentato retinico umano (ARPE-19) (**Dugas B. et al., 2010**).

A livello polmonare è stato osservato che, attraverso l'incremento della fosforilazione ERK-dipendente dell'enzima regolatorio CTP:fosfocolina citidililtransferasi- α (CCT α) che ne diminuisce l'attività, il 22-idrossicolesterolo inibisce la sintesi della fosfatidilcolina del surfattante in una linea cellulare epiteliale di polmone murino (cellule MLE12). Il surfattante polmonare è una miscela, contenente principalmente fosfatidilcolina disaturata e altre

proteine, che fornisce stabilità agli alveoli, abbassando la tensione superficiale e la sua carenza contribuisce al danno polmonare acuto (**Agassandian M. et al., 2005**).

Gli ossisteroli interferiscono con i pathways di proliferazione e differenziamento tra cui ERK e quando somministrati in vitro a linee cellulari tumorali, possono rallentare la proliferazione e provocare la morte cellulare (**de Weille J. et al., 2013**).

L'attività di ERK e quindi la proliferazione cellulare in cellule HeLa sono state promosse da OSBP (la prima di una famiglia di 12 molecole implicate nel trasporto dei lipidi in cui gli altri membri sono proteine OSBP-correlate (ORPs)) in seguito al legame con il colesterolo, mentre il 25-idrossicolesterolo ha mostrato un effetto opposto (**Wang P.Y. et al., 2005**).

Riguardo al ruolo di ERK nella sopravvivenza cellulare, è stato dimostrato che l'attivazione, indotta in cellule monocitiche umane THP-1 dal 7-chetocolesterolo, del pathway MEK→ERK attraverso la tirosina chinasi calcio-dipendente PYK2, agisce come un pathway di sopravvivenza che ritarda l'apoptosi, indotta da questo ossisterolo, attraverso la fosforilazione e quindi l'inattivazione della proteina pro-apoptotica BAD. Il 7-chetocolesterolo può però indurre apoptosi in seguito ad un aumento sostenuto del calcio libero citosolico, che induce il pathway mitocondriale di apoptosi sia attraverso l'attivazione di una fosfatasi calcio-dipendente, la calcineurina (PP2B), che porta alla defosforilazione della proteina pro-apoptotica "BH3 only" BAD, che attraverso il rilascio della proteina pro-apoptotica "BH3 only" Bim e la sua associazione a Bcl-2 in maniera calcio-dipendente. Quindi, l'apoptosi indotta dal 7-chetocolesterolo sembra essere un fenomeno complesso risultante dall'attivazione calcio-dipendente di diversi pathways, due pro-apoptotici e uno anti-apoptotico (**Berthier A. et al., 2005**).

1.3.2.2 p38 - interazione con gli ossisteroli

Identificata contemporaneamente da tre gruppi, p38 α è l'elemento archetipico di una seconda via di segnalazione MAPK che è generalmente più sensibile agli stimoli legati allo stress (**Cargnello M. and Roux P.P., 2011**).

Mentre p38 α e p38 β sono espresse ubiquitariamente nelle linee cellulari e nei tessuti, p38 γ e p38 δ hanno pattern di espressione più ristretti e possono avere funzioni specializzate (**Jiang Y. et al., 1996**). Nelle cellule di mammifero le quattro isoforme di p38 sono fortemente attivate da vari stress ambientali e citochine infiammatorie, che comprendono stress ossidativo, irradiazioni UV, ipossia, ischemia, IL-1 e TNF- α (**Cuadrado A. and Nebreda A.R., 2010**). La maggior parte degli stimoli che attivano le MAPKs p38 stimolano anche le isoforme di JNK e molte MAPKKs nella via di p38 sono condivise dalla via di JNK (**Cargnello M. and Roux P.P., 2011**).

Le isoforme di p38 sono presenti nei nuclei e nel citoplasma delle cellule quiescenti (**Ben-Levy R. et al., 1998**) e hanno mostrato di accumularsi nei nuclei delle cellule sottoposte a determinati stress (**Raingeaud J. et al., 1995**).

Il modulo di p38 gioca un ruolo critico nella risposta immune e infiammatoria (**Cuadrado A. and Nebreda A.R., 2010**). p38 è attivata da numerosi mediatori extracellulari dell'infiammazione che comprendono agenti chemiotattici, citochine, chemochine e l'LPS. Una funzione importante delle isoforme di p38 è la produzione di citochine pro-infiammatorie (**Cargnello M. and Roux P.P., 2011**). p38 può regolare l'espressione delle citochine attraverso la modulazione di fattori di trascrizione, come NF-kB (**Karin M., 2006**), o a livello di mRNA, attraverso la modulazione della loro stabilità e traduzione attraverso la regolazione di MNK1 (**Buxade M. et al., 2008**) ed MK2/3 (**Ronkina N. et al., 2008**). p38 α sembra essere la principale isoforma di p38 coinvolta nella risposta infiammatoria e la sua soppressione nelle cellule epiteliali è stata in grado di ridurre l'espressione di geni pro-infiammatori (**Kim C. et al., 2008**).

Le MAPKs p38 hanno anche mostrato di giocare un ruolo importante nella proliferazione e nella sopravvivenza cellulare (**Cargnello M. and Roux P.P., 2011**). p38 regola negativamente la progressione del ciclo cellulare sia nella transizione G₁/S che in quella G₂/M attraverso una serie di meccanismi che includono la regolazione delle cicline e degli inibitori delle CDK (**Thornton T.M. and Rincon M., 2009**). Sebbene alcuni studi abbiano riportato

una funzione anti-apoptotica per p38, la maggior parte ha associato l'attività di p38 all'induzione dell'apoptosi da parte di stress cellulari (**Cargnello M. and Roux P.P., 2011**). Questi effetti possono essere mediati da meccanismi trascrizionali e post-trascrizionali, che influenzano recettori di morte, vie di sopravvivenza o proteine pro- e anti-apoptotiche della famiglia Bcl-2 (**Cuenda A. and Rousseau S., 2007**).

È stato dimostrato che l'attivazione di p38 indotta dal 22-idrossicolesterolo, un comune ossisterolo presente nella bile, in una linea cellulare di colangiocarcinoma umano (cellule KMBC), è coinvolta nell'induzione della cicloossigenasi-2 (COX-2). Infatti, il 22-idrossicolesterolo, stabilizzando l'mRNA della COX-2 attraverso un meccanismo p38-dipendente, comporta un accumulo di questa proteina che promuove la replicazione cellulare e inibisce l'apoptosi, favorendo la genesi e la progressione di colangiocarcinomi (**Yoon J.H. et al., 2004**).

Attraverso l'induzione della COX-2 in cellule endoteliali gli ossisteroli possono anche agire come un fattore proaterogeno ed è stato dimostrato che p38, così come la via PI3K-Akt-eNOS ed NF- κ B, gioca un ruolo importante nell'induzione da parte del colesterolo-3 β ,5 α ,6 β -triolo della produzione di mRNA e dell'espressione della COX-2, seguita da un significativo incremento della produzione di PGE₂, in cellule endoteliali della vena ombelicale umana (**Liao P.L. et al., 2009**).

1.3.2.3 JNK - interazione con gli ossisteroli

JNK è anche conosciuta come *stress-activated protein kinase* (SAPK). Esistono tre isoforme conosciute di JNK 1, 2 e 3 (**Cargnello M. and Roux P.P., 2011**). JNK 1 e 2 hanno un'ampia distribuzione tissutale mentre JNK 3 sembra essere localizzata principalmente nei tessuti neuronali, nei testicoli e nei miociti cardiaci (**Bode A.M. and Dong Z., 2007**).

Proprio come le MAPKs p38, le isoforme di JNK sono fortemente attivate in risposta a vari stress cellulari, che comprendono shock termico, radiazioni ionizzanti, stress ossidativo, agenti che danneggiano il DNA, citochine, irradiazione UV, inibitori della sintesi di DNA e proteine e deprivazione di fattori di crescita, e in misura minore da fattori di crescita, alcuni ligandi dei GPCR e siero (**Bogoyevitch M.A. et al., 2010**).

Come ERK1/2 e p38 una percentuale di JNKs attivate si rilocalizza dal citoplasma al nucleo dopo stimolazione (**Mizukami Y. et al., 1997**).

JNK1 e JNK2 sono implicate nel controllo della proliferazione cellulare (**Cargnello M. and Roux P.P., 2011**). Attraverso c-Jun, l'attività di JNK promuove la formazione del complesso AP-1 e la trascrizione di geni contenenti siti che legano AP-1, che includono geni che controllano il ciclo cellulare, come la ciclina D1 (**Sabapathy K. et al., 2004**). Oltre ad essere implicate nel differenziamento delle popolazioni ematopoietiche (**Cargnello M. and Roux P.P., 2011**), le isoforme di JNK giocano un ruolo importante nella risposta apoptotica agli stress cellulari (**Dhanasekaran D.N. and Reddy E.P., 2008**).

Attraverso l'attivazione della via di segnalazione IRE1/JNK/AP-1 dipendente dallo stress del reticolo endoplasmatico, il 7- β -chetocolesterolo, uno dei principali ossisteroli presenti nelle oxLDLs, ha favorito l'espressione di NOX4 inducendo così la morte in cellule muscolari lisce aortiche umane (SMCs) (**Pedruzzi E. et al., 2004**).

Recenti studi hanno dimostrato che la segnalazione JNK e PI3K/AKT ha anche un ruolo importante nell'espressione, regolata dai recettori X del fegato (LXRs) nei macrofagi, di diversi geni chiave implicati nell'aterosclerosi.

Gli LXRs sono fattori di trascrizione ligando-dipendenti che vengono attivati dagli ossisteroli. Gli LXRs svolgono un importante ruolo anti-aterogenico in parte stimolando l'efflusso del colesterolo dalle cellule schiumose. L'espressione di ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A1) e dell'Apolipoproteina E (ApoE) indotta dagli LXRs è essenziale per la stimolazione dell'efflusso del colesterolo e la prevenzione dello sviluppo aterosclerotico. In

macrofagi umani, l'espressione di ApoE e ABCA1 indotta dai ligandi sintetici o naturali di LXR (TO901317, GW3965 e il 22-(R)-idrossicolesterolo (22-(R)-HC)) è stata attenuata dagli inibitori di JNK (curcumina e SP600125) e della fosfoinositide-3-chinasi (PI3K) (LY294002) (Huwait E.A. et al., 2011).

1.4 Difese intestinali contro il danno ossidativo

La mucosa intestinale è costantemente attaccata da ossidanti derivanti dalla dieta, mutageni e cancerogeni così come da specie reattive dell'ossigeno generate endogenamente (Aw T.Y., 1999).

I principali ossidanti sono i radicali liberi, atomi, molecole o ioni con elettroni spaiati che sono altamente instabili e attivi nelle reazioni chimiche con altre molecole. Nei sistemi biologici derivano essenzialmente da tre elementi: ossigeno, (ROS), azoto, specie reattive dell'azoto (RNS) e zolfo, specie reattive dello zolfo (RSS). I ROS includono radicali liberi come l'anione superossido ($O_2^{\cdot-}$), il radicale idroperossido (HO_2^{\cdot}), il radicale idrossile (OH^{\cdot}), l'ossido nitrico (NO) e altre specie reattive come il perossido di idrogeno (H_2O_2), l'ossigeno singoletto (1O_2), l'acido ipocloroso (HOCl) e il perossinitrito ($ONOO^-$). Le RNS derivano dalla reazione dell'NO con l' $O_2^{\cdot-}$ da cui si forma $ONOO^-$. Le RSS si formano facilmente dalla reazione dei ROS con i tioli (Lu J.M. et al., 2010). Nell'organismo, i radicali liberi sono prodotti come intermedi metabolici all'interno dei mitocondri, per mezzo della xantina ossidasi, nei perossisomi, nei processi infiammatori, nella fagocitosi, nei pathways dell'acido arachidonico, nell'ischemia e nell'esercizio fisico. Fattori esterni che contribuiscono a promuovere la produzione di radicali liberi sono fumo, inquinanti ambientali, radiazioni, farmaci, pesticidi, solventi industriali e ozono (Lobo V. et al., 2010).

Uno squilibrio tra i meccanismi di difesa, enzimatici e non enzimatici, e la produzione di specie ossidanti, in favore di queste ultime, genera quello che viene definito "stress ossidativo" (Pavlick K.P. et al., 2002).

Lo stress ossidativo è oggi considerato una possibile causa di specifiche alterazioni strutturali e funzionali dei tessuti nel tratto gastrointestinale, come in caso di infiammazione, riossigenazione post-ischemica, intossicazione da xenobiotici, iperossia ed in talune fasi della carcinogenesi.

Per preservare l'integrità cellulare e l'omeostasi tissutale, l'intestino possiede diversi meccanismi di difesa come la capacità di mantenere elevate concentrazioni di antiossidanti (glutazione, tocoferolo e acido ascorbico), regolare i sistemi enzimatici antiossidanti (glutazione perossidasi, glutazione reduttasi e superossido dismutasi) e indurre la morte cellulare per apoptosi in enterociti mal funzionanti o danneggiati (Aw T.Y., 1999).

Halliwell e Gutteridge (**Halliwell B. and Gutteridge J.M., 1995**) hanno definito gli antiossidanti come “qualsiasi sostanza che, quando presente a basse concentrazioni rispetto a quelle di un substrato ossidabile, ritarda significativamente o inibisce l’ossidazione di quel substrato”, ma in seguito li hanno definiti come “qualsiasi sostanza che ritarda, previene o rimuove il danno ossidativo ad una molecola bersaglio” (**Halliwell B., 2007**). Lo stesso anno Khlebnikov e colleghi (**Khlebnikov A.I. et al., 2007**) hanno definito gli antiossidanti come “qualsiasi sostanza che “scavenges” direttamente i ROS o agisce indirettamente aumentando la regolazione delle difese antiossidanti o inibendo la produzione di ROS”. Un’altra proprietà che un composto dovrebbe avere per essere considerato un antiossidante è la capacità, dopo lo “scavenging” del radicale, di formare un nuovo radicale che sia stabile attraverso il legame idrogeno intramolecolare in un’ulteriore ossidazione (**Halliwell B., 1990**). Gli antiossidanti possono agire in vari modi: come inibitori di reazioni di ossidazione dei radicali liberi (preventive antioxidants) inibendo la formazione di radicali liberi lipidici, interrompendo la propagazione della reazione di autossidazione a catena (chain breaking antioxidants), come “quenchers” di ossigeno singoletto, attraverso la sinergia con altri antiossidanti, come agenti riducenti che convertono gli idroperossidi in composti stabili, come chelanti che convertono i metalli pro-ossidanti (derivati del ferro e del rame) in prodotti stabili e infine come inibitori di enzimi pro-ossidanti (lipossigenasi) (**Darmany A.P. et al., 1998; Heim K.E. et al., 2002; Min D.B. and Boff J.M., 2002; Pokorny J., 2007; Kancheva V.D., 2009**).

Il sistema antiossidante a livello intestinale comprende antiossidanti enzimatici e non enzimatici (**Carocho M. and Ferreira I.C., 2013**).

1.4.1 Antiossidanti enzimatici

Gli antiossidanti enzimatici comprendono le difese enzimatiche primarie e secondarie. Per quanto riguarda la difesa primaria, è composta da tre importanti enzimi che prevengono la formazione o neutralizzano i radicali liberi (**Carocho M. and Ferreira I.C., 2013**): la glutatione perossidasi che dona due elettroni per ridurre i perossidi formando selenoli ed elimina anche i perossidi come potenziale substrato per la reazione di Fenton; la catalasi che converte il perossido di idrogeno in acqua e ossigeno molecolare ed infine la superossido dismutasi che converte gli anioni superossido in perossido di idrogeno come substrato per la catalasi (**Rahman K., 2007**). La difesa enzimatica secondaria include la glutatione reduttasi e la glucosio-6-fosfato deidrogenasi. La glutatione reduttasi riporta il glutatione dalla sua forma ossidata a quella ridotta, riciclandolo; la glucosio-6-fosfato deidrogenasi rigenera il NADPH (nicotinammide adenina dinucleotide fosfato, coenzima usato nelle reazioni anaboliche) conservando il potenziale riducente della cellula (**Gamble P.E. and Burke J.J., 1984; Ratnam D.V. et al., 2006**). Questi due enzimi non neutralizzano direttamente i radicali liberi, ma hanno ruoli di supporto agli altri antiossidanti endogeni (**Carocho M. and Ferreira I.C., 2013**).

1.4.1.1 Glutazione perossidasi (GPxs)

Nei mammiferi, le glutazione perossidasi (GPxs) comprendono 8 enzimi (GPx1-GPx8) finora identificati (**Brigelius-Flohé R. and Maiorino M., 2013**).

Le GPxs appartengono ad una famiglia di enzimi filogeneticamente correlati. Le GPx1-4 dei mammiferi sono selenoproteine con una selenocisteina (Sec) nel centro catalitico, la GPx6 è una selenoproteina solo negli esseri umani. In accordo con la filogenesi, la famiglia delle GPxs consiste di tre gruppi evolutivi derivanti da un antenato contenente Cys: GPx1/GPx2, GPx3/GPx5/GPx6 e GPx4/GPx7/GPx8 (**Herbette S. et al., 2007; Margis R. et al., 2008; Toppo S. et al., 2008; Mariotti M. et al., 2012**). Le GPx7 e 8 contenenti Cys hanno evoluto da un antenato GPx4 simile. La GPx5 e la GPx6 sembrano derivare da una duplicazione tandem di GPx3 (**Mariotti M. et al., 2012**). La GPx1 e la GPx2 sono un sub-clade delle GPxs tetrameriche costituite da GPx1-3, 5 e 6 (**Toppo S. et al., 2008**).

Per decenni alle GPxs è stata attribuita la capacità di catalizzare la riduzione dell'H₂O₂ o degli idroperossidi organici ad acqua o i corrispondenti alcoli, rispettivamente, tipicamente utilizzando il glutazione (GSH) come riducente (**Ursini F. et al., 1995**). È stato suggerito che la presenza della Sec come porzione catalitica garantisca una reazione veloce con gli idroperossidi ed una veloce riducibilità da parte del GSH. Questa caratterizzazione è stata ben accettata solo fino a quando erano note le prime quattro GPxs. Esse sembravano avere una funzione antiossidante in diverse localizzazioni e compartimenti cellulari, la GPx1 ubiquitariamente nel citosol e nei mitocondri, la GPx2 nell'epitelio intestinale, la GPx3 nel plasma; tutte e tre quindi funzionavano nella fase acquosa, mentre la GPx4 sembrava proteggere le membrane dall'attacco ossidativo. La situazione è diventata più complessa quando le successive quattro GPxs sono state scoperte (**Brigelius-Flohé R. and Maiorino M., 2013**): la GPx5, contenente una cisteina invece di una Sec nel centro attivo è stata caratterizzata come una proteina secreta nell'epididimo (**Ghyselinck N.B. and Dufaure J.P., 1990**); la GPx6 che è risultata essere una selenoproteina nell'uomo ma non in ratti o topi (**Kryukov G.V. et al., 2003**) ed è espressa nell'epitelio olfattivo (**Dear T.N. et al., 1991**); la GPx7 e la GPx8 che sono CysGPxs con una bassa attività perossidasi (**Brigelius-Flohé R. and Maiorino M., 2013**).

Il ruolo individuale delle 8 GPxs finora note non è del tutto chiaro. Potrebbero tutte essere in grado di ridurre gli idroperossidi:



e svolgere dunque una funzione correlata alla rimozione e/o al loro metabolismo. Poiché il processo di cancerogenesi può essere influenzato dagli idroperossidi, le GPxs potrebbero svolgere un importante ruolo nell'inibizione della carcinogenesi (**Brigelius-Flohé R. and Kipp A., 2009**).

La **GPx1** è stata la prima selenoproteina identificata (**Flohé L. et al., 1973; Rotruck J.T. et al., 1973**). È un omotetramero e reagisce con l' H_2O_2 e gli idroperossidi solubili a bassa massa molecolare, come il t-butil idroperossido, il cumene idroperossido, gli acidi grassi idroperossidi (**Flohé L., 1989**) e persino i lisofosfatidi idroperossidi (**Marinho H.S. et al., 1997**), ma non con gli idroperossidi di lipidi più complessi che sono il dominio della GPx4 (**Brigelius-Flohé R. and Maiorino M., 2013**). A causa della sua capacità di ridurre gli idroperossidi, la GPx1 è stata classificata come il principale enzima che contrasta lo stress ossidativo. È stato chiaramente dimostrato che la GPx1 non può essere sostituita da una qualsiasi altra selenoproteina nel proteggere dallo stress ossidativo e che svolge una primaria funzione antiossidante in vivo (**Brigelius-Flohé R. and Maiorino M., 2013**).

Alla sua funzione antiossidante, in particolare alla capacità di regolare l'omeostasi dell' H_2O_2 , è correlata la modulazione delle vie di segnalazione intracellulare coinvolte nella risposta infiammatoria; alla GPx1 viene spesso associata, infatti, anche una attività anti-infiammatoria (**Brigelius-Flohé R. and Maiorino M., 2013**).

La **GPx2** è un omotetramero ed è strettamente correlata alla GPx1 (**Brigelius-Flohé R. and Maiorino M., 2013**). La GPx2 è espressa principalmente nel sistema gastrointestinale incluso l'epitelio dell'esofago e, nell'uomo, anche nel fegato. È stata nominata GI-GPx o GPx-GI e si pensa che agisca come una barriera contro l'assorbimento degli idroperossidi di origine alimentare (**Chu F.F. et al., 1993**). Alte concentrazioni della proteina GPx2 si trovano alla base delle cripte e gradualmente diminuiscono al vertice delle cripte nel colon o nei villi nell'intestino tenue, rispettivamente (**Florian S. et al., 2001**). Dato che la base della cripta non è la posizione preferenziale per l'assorbimento, la prevenzione dell'uptake degli idroperossidi difficilmente può essere la principale funzione della GPx2 (**Brigelius-Flohé R. and Maiorino M., 2013**).

La localizzazione della GPx2 nelle basi delle cripte coincide con la posizione delle cellule staminali proliferanti. La crescita e la differenziazione delle cellule staminali intestinali sono regolate dal pathway Wnt (**Pinto D. et al., 2003**) e la GPx2 è stata identificata come bersaglio

di tale pathway (**Kipp A. et al., 2007; Kipp A.P. et al., 2012**); la co-localizzazione della GPx2 e del pathway Wnt, nonché la regolazione dell'espressione della GPx2 tramite segnali Wnt, dimostra che la GPx2 è direttamente coinvolta nel continuo auto-rinnovamento dell'epitelio intestinale e quindi nell'omeostasi della mucosa (**Brigelius-Flohé R. and Maiorino M., 2013**).

La GPx2 può essere considerata anti-infiammatoria in quanto è in grado di diminuire l'espressione della COX2 e la produzione di PGE₂ (**Banning A. et al., 2008**).

Lo sviluppo di colite e tumori dipende anche dalla presenza di batteri intestinali; animali privi di germi non sviluppano eventuali malattie (**Chu F.F. et al., 2004**). Le cellule di Paneth nelle cripte dell'intestino tenue esprimono enzimi con attività antibatterica per contrastare il continuo attacco proinfiammatorio dal microbiota. La GPx2 è nettamente espressa nelle cellule di Paneth (**Florian S. et al., 2001**) e può contribuire a questa particolare risposta immune (**Brigelius-Flohé R. and Maiorino M., 2013**).

È stato dimostrato che la GPx2 svolge un duplice ruolo nella carcinogenesi a livello del colon a seconda della modalità di iniziazione e dallo stadio del tumore. Grazie alla sua attività anti-infiammatoria può inibire l'iniziazione della tumorigenesi quando è associata all'infiammazione; non sembra invece svolgere un'azione inibente nella fase di promozione, che viene al contrario sostenuta (**Brigelius-Flohé R. and Maiorino M., 2013**).

Anche la **GPx3** è simile alla GPx1 ed è un tetramero. La GPx3 è un enzima extracellulare rilasciato attivamente nel plasma dove si trova senza sequenza leader come proteina glicosilata (**Brigelius-Flohé R. and Maiorino M., 2013**).

La GPx3 viene sintetizzata nel tubulo contorto prossimale del rene (**Avissar N. et al., 1994**) e secreta basolateralmente nel plasma (**Whitin J.C. et al., 2002**), ma è stata trovata anche in altri tessuti. Insieme alla selenoproteina P, la GPx3 rappresenta oltre il 97% di tutto il selenio plasmatico nei topi (**Olson G.E. et al., 2010**). L'elevata quantità nel plasma fa pensare ad un ruolo della GPx3 anche nel trasporto e nell'omeostasi del selenio. Tuttavia, non è stata trovata nessuna prova a sostegno di questa ipotesi (**Olson G.E. et al., 2010**). La GPx3 è stata anche rilevata in altri fluidi corporei extracellulari come l'umor acqueo dell'occhio, il lume colloidale della tiroide (**Kohrle J., 2005; Schomburg L. and Kohrle J., 2008**), nel tessuto adiposo (**Maeda K. et al., 1997**) e nel liquido amniotico (**Brigelius-Flohé R., 1999**). È stato recentemente scoperto che la GPx3 si lega alle membrane basali non solo delle cellule tubulari della corteccia nel rene (**Olson G.E. et al., 2010; Malinouski M. et al., 2012**), ma

anche alle membrane basali delle cellule epiteliali in tutto l'intestino, dell'epididimo, dei bronchi e dei pneumociti di tipo II (**Burk R.F. et al., 2011**). La GPx3 che deriva dal rene può essere trasportata per legarsi alla membrana basale presente in altri tessuti. Un'eccezione è l'epididimo che sintetizza la propria GPx3 e la rilascia nel suo lume (**Burk R.F. et al., 2011**). Il legame della GPx3 è specifico e limitato a determinate popolazioni cellulari, il che indica che le cellule possono modificare le loro membrane basali per fornire siti di legame alla GPx3 secondo le loro necessità per l'enzima (**Olson G.E. et al., 2010; Burk R.F. et al., 2011**). L'associazione di GPx3 alla membrana potrebbe spiegare una funzione perossidasi nonostante basse concentrazioni plasmatiche di GSH (**Brigelius-Flohé R. and Maiorino M., 2013**).

Come le altre GPxs, la GPx3 può impedire l'attivazione idroperossido-mediata delle lipossigenasi. L'attivazione delle LOX_s può amplificare qualsiasi risposta fagocitica iniziale o altrimenti attivare il rilascio di O₂^{•-} da parte delle NOX e portare ad una risposta infiammatoria completa se l'H₂O₂ non viene eliminato immediatamente. La GPx3 può prevenire tale amplificazione del segnale alle membrane e, quindi, un'eccessiva risposta infiammatoria. Se una certa soglia di "burst ossidativo" viene superata ed è richiesta una reazione reale dell'ospite, la GPx3 non può funzionare più a lungo a causa del limitato substrato riducente (**Brigelius-Flohé R., 1999; Flohé L. and Brigelius-Flohé R., 2006**). In alternativa, la GPx3 può utilizzare la tioredoxina extracellulare e/o la glutaredossina che hanno effluito dal compartimento intracellulare come equivalenti riducenti (**Ottaviano F.G. et al., 2008**).

Un ruolo della GPx3 nei processi infiammatori può essere dedotto dalla sua aumentata regolazione nel plasma di bambini con patologia infiammatoria intestinale (**Hoffenberg E.J. et al., 1997**), nel liquido del rivestimento epiteliale nei polmoni di pazienti asmatici (**Comhair S.A. et al., 2001**) e in topi con colite sperimentale (**Tham D.M. et al., 2002**).

L'obesità può essere associata con lo stress ossidativo (**Keaney J.F., Jr. et al., 2003**). Il tessuto adiposo bianco e bruno esprime elevate quantità di GPx3, che sono significativamente ridotte nei topi obesi. Una diminuzione di GPx3 si verifica anche nel plasma ma non in altri organi (**Lee Y.S. et al., 2008**). I livelli di proteina GPx3 e l'attività GPx plasmatica totale diminuiscono in soggetti umani obesi. La compromessa produzione di GPx3 nell'obesità favorisce l'infiammazione, l'ossidazione sistemica e le complicazioni metaboliche connesse all'obesità (**Brigelius-Flohé R. and Maiorino M., 2013**).

La **GPx4** è un monomero (**Brigelius-Flohé R. and Maiorino M., 2013**). Era stata inizialmente caratterizzata come proteina inibente la perossidazione lipidica (PIP) (**Ursini F. et al., 1982**) a causa della sua capacità unica di ridurre, oltre ad H₂O₂ e piccoli idroperossidi in generale, idroperossidi in lipidi complessi come fosfolipidi, idroperossidi del colesterolo e degli esteri del colesterolo, anche quando sono inseriti in membrane o lipoproteine (**Thomas J.P. et al., 1990**). La GPx4 esiste in tre differenti isoforme, una citosolica (cGPx4), una mitocondriale (mGPx4) e una sperma nucleare (snGPx4). Mentre la cGPx4 è onnipresente nelle cellule, la mGPx4, come la snGPx4, è principalmente espressa nel testicolo e presente solo in quantità marginali negli altri tessuti (**Brigelius-Flohé R. and Maiorino M., 2013**).

La GPx4 ha un ruolo nella regolazione dell'apoptosi e, insieme alla GPx5, della fertilità maschile (**Brigelius-Flohé R. and Maiorino M., 2013**).

La **GPx5** è una CysGPx epididimo-specifica in topi, ratti, maiali, scimmie ed esseri umani. È l'omologo più vicino alla GPx3. Insieme alla GPx3, la GPx5 rappresenta oltre il 95% dell'RNA e della proteina GPx epididimale (**Brigelius-Flohé R. and Maiorino M., 2013**). La sua funzione consiste nella regolazione della fertilità (**Brigelius-Flohé R. and Maiorino M., 2013**).

La **GPx6** è un omologo stretto della GPx3 ed è una selenoproteina nell'uomo, ma una CysGPx nei roditori e in altre specie (**Kryukov G.V. et al., 2003**). Come la GPx3, la GPx6 è un omotetramero (**Brigelius-Flohé R. and Maiorino M., 2013**) e le sue funzioni sono ancora sconosciute (**Brigelius-Flohé R. and Maiorino M., 2013**).

La **GPx7**, a causa della sua omologia con la idroperossido fosfolipidico GPx (PHGPx=GPx4) è stata chiamata non selenocisteina PHGPx (NPGPx). Come la GPx4, la NPGPx è un monomero ma, a differenza della GPx4, ha poca attività GPx. La NPGPx è stata per la prima volta descritta come una proteina citoplasmatica (**Brigelius-Flohé R. and Maiorino M., 2013**). È stato successivamente trovato che la GPx7 è collocata nel lume del reticolo endoplasmatico (**Nguyen V.D. et al., 2010**). Le funzioni attribuite alla GPx7 sono putative. Sembra esserci una relazione inversa tra la proliferazione delle cellule tumorali e la GPx7 che potrebbe dunque avere la funzione di soppressore tumorale; è stata proposta inoltre una funzione antiossidante e un coinvolgimento della GPx7 e della GPx8 nel folding delle proteine (**Brigelius-Flohé R. and Maiorino M., 2013**).

La **GPx8** è stata scoperta come un nuovo membro appartenente alla famiglia delle GPx in mammiferi e anfibi (**Brigelius-Flohé R. and Maiorino M., 2013**) ed è una proteina di membrana del reticolo endoplasmatico (**Nguyen V.D. et al., 2010**).

Le GPxs possono esercitare diversi effetti nel processo di cancerogenesi. Le cellule tumorali producono elevate quantità di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e si sottraggono all'apoptosi. Gli idroperossidi favoriscono la proliferazione, l'invasione, la migrazione e l'angiogenesi, ma a livelli superiori inducono l'apoptosi, sono quindi pro e anti cancerogeni. Di conseguenza, anche le GPxs che regolano i livelli di idroperossidi potrebbero avere un doppio ruolo. La GPx1, un enzima chiaramente antiossidante, è sotto regolato in molte cellule tumorali. Il suo ruolo principale sarebbe la prevenzione dell'iniziazione del cancro da danno al DNA mediato dai ROS. La GPx2 è sovraespressa nelle cellule tumorali. Topi doppio knockout GPx1/GPx2 sviluppano colite e cancro intestinale. Tuttavia, cellule tumorali GPx2 knockdown crescono meglio *in vitro* e *in vivo* riflettendo probabilmente il ruolo fisiologico della GPx2 nell'omeostasi della mucosa intestinale. La GPx2 contrasta l'espressione della COX-2 e la produzione della PGE2, il che spiega la sua capacità di inibire la migrazione e l'invasione delle cellule tumorali in coltura. L'aumento di espressione della GPx3 inibisce crescita tumorale e metastasi. La GPx4 è ridotta nei tessuti tumorali. Le cellule tumorali con aumentata espressione della GPx4 hanno una bassa attività della COX-2 e i tumori da esse derivati sono più piccoli rispetto alle cellule di controllo e non metastatizzano.

La GPx4 inibisce ma la GPx2 sostiene la crescita di tumori proliferanti. Le metastasi, ma anche l'apoptosi, sono inibite da tutte le GPxs. La regolazione da parte della GPx delle attività di COX/LOX può essere rilevante nei primi stadi della cancerogenesi mediata dall'infiammazione (**Brigelius-Flohé R. and Kipp A., 2009**).

1.4.2 Antiossidanti non enzimatici

Gli antiossidanti non enzimatici comprendono vitamine (C, E, A, K), cofattori enzimatici (Q10), composti azotati (acido urico), peptidi (GSH), polifenoli, carotenoidi e minerali (selenio e zinco) (**Carocho M. and Ferreira I.C., 2013**).

L'acido ascorbico (vitamina C) include due composti con attività antiossidante: l'acido L-ascorbico e l'acido L-deidroascorbico che vengono assorbiti attraverso il tratto gastrointestinale e possono essere interscambiabili enzimaticamente *in vivo*. L'acido ascorbico è efficace nello "scavenging" del radicale anione superossido, del perossido di idrogeno, del radicale idrossile, dell'ossigeno singoletto e dell'ossido di azoto (**Barros A.I.R.N.A. et al., 2011**). Le fonti alimentari di vitamina C includono agrumi, fragole, meloni, pomodori, broccoli e peperoni (**Fairfield K.M. and Fletcher R.H., 2002**).

La vitamina E comprende otto isoforme, quattro tocoferoli (α , β , γ , δ) e quattro tocotrienoli (α , β , γ , δ). L' α -tocoferolo è la più potente e abbondante isoforma nei sistemi biologici. La vitamina E blocca la perossidazione lipidica donando il suo idrogeno fenolico ai radicali perossilici, formando il radicale tocoferossile che, pur essendo radicale, è incapace di continuare la reazione ossidativa a catena. La vitamina E è l'unico "chain breaking antioxidant" liposolubile trovato nel plasma e nei tessuti, dove protegge l'integrità delle strutture lipidiche, principalmente le membrane (**Burton G.W. and Traber M.G., 1990**). Queste due vitamine mostrano anche un comportamento sinergico, con la rigenerazione della vitamina E attraverso la vitamina C dal radicale tocoferossile ad una forma intermedia, ripristinando quindi il suo potenziale antiossidante (**Halpner A.D. et al., 1998**). Le principali fonti alimentari di vitamina E includono oli vegetali, legumi e noci (**Fairfield K.M. and Fletcher R.H., 2002**).

La vitamina A o retinolo è un carotenoide prodotto nel fegato e deriva dalla rottura del β -carotene. Sono state isolate circa una dozzina di forme di vitamina A. È nota per avere effetti benefici sulla pelle, gli occhi e gli organi interni. Quello che le conferisce l'attività antiossidante è la capacità di combinarsi con i radicali perossilici impedendo la propagazione della perossidazione lipidica (**Palace V.P. et al., 1999; Jee J.P. et al., 2006**).

La vitamina K comprende un gruppo di composti liposolubili, indispensabili per la conversione post traslazionale delle molecole di glutammato legate alle proteine in γ -carbossiglutamato in varie proteine bersaglio. La struttura 1,4-naftochinone di queste vitamine

conferisce l'effetto protettivo antiossidante. Le due isoforme naturali di questa vitamina sono K₁ e K₂ (**Vervoort L.M. et al., 1997**). Fonti alimentari di vitamina K sono le verdure di colore verde scuro, in particolare gli spinaci (**Fairfield K.M. and Fletcher R.H., 2002**).

Il coenzima Q10 è presente in tutte le cellule e le membrane; svolge un ruolo importante nella catena respiratoria e in altri processi metabolici. Il coenzima Q10 agisce impedendo la formazione di radicali perossilici lipidici, ma può neutralizzarli anche dopo la loro formazione. Un'altra importante funzione è la capacità di rigenerare la vitamina E (**Turunen M. et al., 2004**).

L'acido urico è il prodotto finale del metabolismo dei nucleotidi purinici nell'uomo. È noto per prevenire la sovrapproduzione di ossidanti oxo-eme che derivano dalla reazione dell'emoglobina con i perossidi; previene la lisi degli eritrociti dovuta alla perossidazione ed è un potente "scavenger" di ossigeno singoletto e radicali idrossilici (**Kand'ar R. et al., 2006**).

I polifenoli sono i più abbondanti antiossidanti nella nostra dieta e sono presenti nella frutta, verdura, cereali, olive, legumi secchi, cioccolato e bevande, come tè, caffè e vino (**D'Archivio M. et al., 2007**).

I più diffusi fra i composti fenolici sono i flavonoidi, un gruppo di composti antiossidanti che comprende flavonoli, flavanoli, antocianine, isoflavonoidi, flavanoni e flavoni, che condividono lo stesso scheletro difenilpropano (C₆C₃C₆). Le proprietà antiossidanti sono conferite nei flavonoidi dai gruppi idrossilici fenolici legati alle strutture ad anello e possono agire come agenti riducenti, donatori di idrogeno, "quencher" di ossigeno singoletto, "scavengers" del radicale superossido e anche come chelanti di metalli. Attivano inoltre gli enzimi antiossidanti, riducono i radicali dell' α -tocoferolo (tocoferossili), inibiscono le ossidasi, mitigano lo stress nitrosativo e incrementano i livelli di acido urico e di molecole antiossidanti a basso peso molecolare (**Rice-Evans C.A. et al., 1996; Prochazkova D. et al., 2011**). Gli acidi fenolici, anch'essi polifenoli, comprendono acidi idrossicinnamici e idrossibenzoici. Sono onnipresenti nel materiale vegetale, a volte come esteri e glicosidi. Hanno un'attività antiossidante come chelanti e "scavengers" di radicali liberi, in particolare radicali idrossilici e perossilici, anioni superossido e perossinitrito (**Krimmel B. et al., 2010; Terpin P. et al., 2011**).

I carotenoidi sono un gruppo di pigmenti naturali sintetizzati da piante e microrganismi ma non dagli animali. Possono essere divisi in due grandi gruppi: i carotenoidi idrocarburici noti come caroteni, che contengono gruppi terminali specifici come il licopene e il β -carotene e i

carotenoidi ossigenati noti come xantofille, come zeaxantina e luteina. La principale proprietà antiossidante dei carotenoidi è dovuta al "quenching" dell'ossigeno singoletto (**Paiva S.A. and Russell R.M., 1999**).

Frutti e vegetali sono una ricca fonte di carotenoidi. Le maggiori fonti alimentari di β -carotene comprendono i vegetali a foglia verde, così come frutti e vegetali arancioni e gialli. Il licopene alimentare invece deriva principalmente dal pomodoro e dai suoi derivati. Luteina e zeaxantina sono abbondanti in spinaci e cavolo (**Krinsky N.I. and Johnson E.J., 2005**).

I minerali costituiscono una piccola percentuale degli antiossidanti nella dieta, ma svolgono un ruolo importante nel metabolismo animale. Per quanto riguarda l'attività antiossidante i minerali più importanti sono il selenio e lo zinco (**Carocho M. and Ferreira I.C., 2013**). Il selenio è indispensabile per l'attività della maggior parte degli enzimi antiossidanti (metalloenzimi, glutatione perossidasi e tioredoxina riduttasi) (**Tabassum A. et al., 2010**). Fonti alimentari di selenio sono cereali, pesce e carni (**Shirai T. et al., 2002**).

Lo zinco è un minerale essenziale per diverse vie metaboliche. Proprio come il selenio, non agisce direttamente sui radicali liberi ma è importante nella prevenzione della loro formazione. Lo zinco è anche un inibitore della NOX che catalizza la produzione del superossido utilizzando il NADPH come donatore di elettroni. È presente nella superossido dismutasi, un importante enzima antiossidante che converte l'ossigeno singoletto in perossido di idrogeno. Lo zinco induce la produzione di metallothioneina, "scavenger" del radicale idrossile. Infine, lo zinco compete anche con il rame per il legame alla parete cellulare, diminuendo così ancora una volta la produzione dei radicali idrossilici (**Prasad A.S. et al., 2004**). Sono fonti alimentari di zinco cereali, carne e prodotti lattiero caseari (**Lim K.H. et al., 2013**).

Il GSH è un tripeptide endogeno che protegge le cellule dai radicali liberi donando un atomo di idrogeno o un elettrone. È anche molto importante nella rigenerazione di altri antiossidanti come l'ascorbato (**Steenvoorden D.P. and van Henegouwen G.M., 1997**).

1.4.2.1 Glutazione (GSH)

L'omeostasi redox tiolo-disolfuro intracellulare ed extracellulare è centrale per la funzione e l'integrità intestinale (**Circu M.L. and Aw T.Y., 2011**). Il controllo omeostatico dell'ambiente redox dell'epitelio intestinale è fondamentale per le funzioni dell'organo nella digestione e nell'assorbimento dei nutrienti, nella proliferazione delle cellule staminali, nell'apoptosi degli enterociti apicali e nella risposta immune (**Circu M.L. and Aw T.Y., 2011; Circu M.L. and Aw T.Y., 2012**).

I sistemi redox tiolo/disolfuro, che comprendono le coppie redox glutazione/glutazione disolfuro (GSH/GSSG), cisteina/cistina (Cys/CySS) e tioredoxina ridotta e ossidata (Trx/TrxSS), giocano un ruolo importante nel preservare l'omeostasi redox del tessuto, le funzioni metaboliche e l'integrità cellulare. Il controllo dello stato tiolo-disolfuro sulla superficie luminale è essenziale per mantenere la fluidità del muco e l'assorbimento delle sostanze nutritive e la protezione contro il danno ossidativo indotto chimicamente. All'interno delle cellule intestinali, queste coppie redox preservano un ambiente che supporta i processi fisiologici e controlla le reti di reazioni enzimatiche contro lo stress ossidativo (**Circu M.L. and Aw T.Y., 2011**).

La specificità della segnalazione redox è realizzata in parte tramite la compartimentazione subcellulare dei singoli sistemi redox all'interno di mitocondri, nucleo, reticolo endoplasmatico e citosol, dove ciascun ambiente redox è adatto alla specifica funzione metabolica all'interno di tale comparto. Lo stress ossidativo risultante dalla perturbazione di questi diversi comparti e la conseguente alterazione nella complessiva segnalazione redox cellulare può contribuire allo sviluppo di patologie degenerative dell'intestino, quali infiammazione e cancro (**Circu M.L. and Aw T.Y., 2012**).

Nei sistemi biologici, le coppie redox GSH/GSSG, Trx/TrxSS e Cys/CySS funzionano come nodi o circuiti distinti nel controllo redox del metabolismo e della crescita cellulare (**Go Y.M. and Jones D.P., 2008**). Per questo motivo lo stress ossidativo cellulare è stato ridefinito come l'interruzione degli eventi biologici di segnalazione redox (**Jones D.P., 2006**), in contrasto con la visione classica di stress ossidativo semplicemente come uno squilibrio tra i sistemi pro e antiossidanti (**Sies H., 1985**).

L'ambiente redox extracellulare/luminale è in gran parte determinato dalla coppia redox Cys/CySS con il contributo del sistema GSH (**Dahm L.J. and Jones D.P., 2000**). Le coppie

redox plasmatiche Cys/CySS e GSH/GSSG sono spostate dall'equilibrio con valori di E_h strettamente regolati a -80mV e -140mV, rispettivamente (**Moriarty-Craige S.E. and Jones D.P., 2004**; **Go Y.M. and Jones D.P., 2008**). Le effettive concentrazioni extracellulari di Cys e CySS sono basse, 40 μ M e 8-10 μ M rispettivamente, e sono modulate da Cys/CySS alimentare (**Park Y. et al., 2010**), idrolisi del GSH (**Dickinson D.A. and Forman H.J., 2002**), reazioni di scambio tiolo-disolfuro (**Stipanuk M.H., 2004**) e lo *shuttle* Cys/CySS (**Lash L.H. and Jones D.P., 1984**). Uno stato redox plasmatico ossidato della Cys/CySS è stato associato con patologie come diabete, malattie cardiovascolari e aterosclerosi (**Moriarty-Craige S.E. and Jones D.P., 2004**); quindi, variazioni plasmatiche di Cys/CySS potrebbero essere utilizzate come indice di salute o malattia (**Blanco R.A. et al., 2007**).

La Cys/CySS luminale contribuisce principalmente a mantenere lo stato redox tiolo-disolfuro delle proteine extracellulari (**Gilbert H.F., 1990**) e del lume (**Dahm L.J. and Jones D.P., 1994**). Nell'intestino di ratto, circa il 40% della Cys del lume deriva dall'idrolisi del GSH che ha partecipato all'assorbimento dei nutrienti (**Scharrer E. et al., 1992**) e alla conservazione del muco (**Snary D. et al., 1970**). Lo stato redox tiolo-disolfuro luminale è regolato attraverso lo *shuttle* Cys/CySS (**Dahm L.J. and Jones D.P., 2000**) che coinvolge il rilascio della Cys luminale (**Dahm L.J. and Jones D.P., 1994**), la riduzione del GSSG e formazione della CySS (**Dahm L.J. and Jones D.P., 2000**) seguita dall'assorbimento della CySS (**Neil M.W., 1959**), la riduzione intracellulare della CySS mediata dal GSH e il rilascio della Cys nel lume (**Circu M.L. and Aw T.Y., 2012**). Nelle cellule Caco-2 polarizzate, gli E_h per Cys/CySS sulle superfici basali e apicali sono regolati a tassi diversi (**Mannery Y.O. et al., 2010**), il che implica meccanismi di segnalazione redox indipendenti nelle opposte superfici della membrana polare (**Circu M.L. and Aw T.Y., 2012**).

Anche la tioredoxina (Trx) funziona nella difesa antiossidante e nella regolazione redox (**Godoy J.R. et al., 2011**) attraverso la riduzione dei legami disolfuro tra cisteine nelle proteine (**Circu M.L. and Aw T.Y., 2012**). Ha un ruolo importante nella risposta immunitaria e nell'immunità innata dell'intestino (**Circu M.L. and Aw T.Y., 2012**). La Trx1 e la Trx2 sono isoforme regolate indipendentemente, specifiche per citosol/nucleo e mitocondri (**Hansen J.M. et al., 2006**). Gli E_h della Trx1 e della Trx2 sono altamente ridotti, tra -300mV e -330mV (**Kemp M. et al., 2008**). Gli isoenzimi Trx reduttasi contenenti selenio catalizzano la riduzione NADPH-dipendente della Trx ossidata (**Circu M.L. and Aw T.Y., 2012**).

Il rapporto di GSH/GSSG approssima l'ambiente redox intracellulare data la grande dimensione del pool di GSH cellulare (**Schafer F.Q. and Buettner G.R., 2001**); la tendenza del GSH a donare o accettare elettroni è determinata dal suo potenziale redox (E_h) che in condizioni fisiologiche è tra -260 e -200mV (**Go Y.M. and Jones D.P., 2008**).

Il GSH è presente nell'epitelio intestinale in concentrazioni millimolari (**Aw T.Y. and Williams M.W., 1992; Aw T.Y. et al., 1992; Aw T.Y., 1994**) simili a quelle di altri tipi cellulari (2-10 mM) (**Meister A. and Anderson M.E., 1983**). Il GSH intracellulare è principalmente in forma ridotta biologicamente attiva e la sua ossidazione a GSSG è spesso associata allo stress ossidativo (**Circu M.L. and Aw T.Y., 2012**). L'omeostasi redox del GSH mucosale è mantenuta attraverso la sintesi *de novo* (**Aw T.Y. et al., 1991**), la rigenerazione del GSSG (**Shan X.Q. et al., 1990**) e l'*uptake* del GSH (**Hagen T.M. and Jones D.P., 1987; Aw T.Y. and Williams M.W., 1992**). L'assorbimento del GSH mucosale attraverso la membrana apicale si verifica indipendentemente dalla sintesi di GSH intracellulare (**Aw T.Y. et al., 1991**) ed è stimolato da cationi monovalenti (**Hagen T.M. and Jones D.P., 1987; Vincenzini M.T. et al., 1989**), come accade anche nelle cellule del tubulo prossimale renale (**Hagen T.M. et al., 1988**). La riduzione del GSSG intestinale con formazione di GSH richiede la presenza di NADPH (**Aw T.Y. and Rhoads C.A., 1994**).

Il GSH luminale, derivato dall'assunzione con la dieta e dalla produzione biliare (**Aw T.Y., 1994; Ballatori N. and Rebbeor J.F., 1998**), è un pool dinamico importante nelle funzioni di assorbimento e detossificazione e nella protezione del muco (**Dahm L.J. and Jones D.P., 1994**). Si stima che il GSH nel lume duodenale sia rappresentato per il 50% da GSH epatico (**Aw T.Y., 1994; Ballatori N. and Rebbeor J.F., 1998**). Il contributo della dieta è più vario e dipende dal consumo di alimenti ricchi o carenti di GSH (**Jones D.P. et al., 1992**). Fonti ricche di GSH includono frutti freschi, vegetali e carne magra, mentre gli alimenti lavorati, il grano e i prodotti lattiero caseari generalmente sono poveri di GSH (**Jones D.P. et al., 1992; He M. et al., 2004**).

Le funzioni del GSH luminale includono la riduzione dei disolfuri della dieta (**Dahm L.J. and Jones D.P., 2000**), la coniugazione di elettrofili/xenobiotici (**Ames B.N., 1983**), lo *scavenging* di metalli bivalenti (**Ballatori N. et al., 2009**) e il mantenimento della fluidità del muco attraverso l'assemblaggio/disassemblaggio degli oligomeri di mucina (**Hudson V.M., 2004**). Inoltre, un elevato GSH luminale promuove l'assorbimento dei perossidi lipidici luminali e riduce il trasporto dei perossidi linfatici (**Aw T.Y. et al., 1992; Aw T.Y., 2005**). A

parte l'assorbimento mucosale, il GSH luminale può essere idrolizzato dalla γ -glutamyl-transpeptidasi della membrana apicale (**Hagen T.M. et al., 1990**).

La distribuzione compartimentale del GSH probabilmente esiste in tutti i tipi cellulari, inclusi gli enterociti (**Circu M.L. and Aw T.Y., 2012**). Il GSH cellulare è distribuito tra mitocondri, reticolo endoplasmatico (ER) e nucleo come distinti pool redox di GSH (**Kemp M. et al., 2008**). I livelli di GSH sono elevati nei compartimenti mitocondriale, citosolico e nucleare con un E_h relativamente ridotto tra -260mV e -300mV (**Go Y.M. and Jones D.P., 2008**). In contrasto, la matrice del reticolo endoplasmatico mostra un E_h tra -170mV e -205mV (**Dixon B.M. et al., 2008**). La grande differenza nel potenziale redox nei differenti organelli ben si adatta alla specifica funzione biologica o metabolica di quel compartimento (**Circu M.L. and Aw T.Y., 2012**). Per esempio, l'ambiente ossidato del reticolo endoplasmatico supporta la corretta piegatura delle proteine nascenti (**Bass R. et al., 2004**), mentre, un E_h del GSH/GSSG di -255mV nello spazio intermembrana del mitocondrio rende possibile la formazione di legami disolfuro tra proteine provenienti dal citosol (**Herrmann J.M. and Riemer J., 2010**), nonostante la matrice mostri un E_h del GSH più ridotto (-300mV) (**Rebrin I. and Sohal R.S., 2004**). Mentre l'equilibrio del GSH nella matrice si ottiene attraverso il trasporto del GSH mediato dai carrier dal citosol ai mitocondri (**Chen Z. and Lash L.H., 1998**), non è chiaro come lo spazio intermembrana mitocondriale mantenga un E_h ossidato nonostante il libero accesso del GSH citosolico attraverso le porine (**Koehler C.M. et al., 2006**). L'interazione del GSH citosolico con quello nucleare è dinamica, in particolare durante il ciclo cellulare in cui il GSH nucleare aumenta di 4 volte (**Markovic J. et al., 2007**). Un dilemma irrisolto è la supposizione che il GSH nucleare venga mantenuto indipendentemente dal GSH citosolico (**Go Y.M. and Jones D.P., 2008**), nonostante il fatto che il trasporto del GSH dal citosol al nucleo si verifichi per diffusione passiva attraverso i pori nucleari (**Ho Y.F. and Guenther T.M., 1997**).

Il GSH intestinale è inoltre importante per la funzionalità degli enzimi GSH-dipendenti, come le glutatione perossidasi, le glutatione reduttasi, le glutatione transferasi e le glutaredossine, che sono compartimentalizzati nel citosol, nei mitocondri e nel nucleo (**Circu M.L. and Aw T.Y., 2012**). Gli isoenzimi della glutaredossina (Grx), Grx1 e Grx2, sono localizzati in citosol e mitocondri, rispettivamente, dove partecipano alla riduzione del GSSG o dei disolfuri GSH-misti attraverso gli scambi tiolo-disolfuro (**Fernandes A.P. and Holmgren A., 2004**). La localizzazione e l'elevata espressione della Grx2 in enterociti duodenali di topo (**Godoy J.R.**

et al., 2011) suggerisce un ruolo importante di questo enzima nelle reazioni redox (**Circu M.L. and Aw T.Y., 2012**). La Grx3, che è priva di attività ossidoreduttasica, serve come un sensore *redox* durante la segnalazione indotta dalle specie reattive dell'ossigeno o dell'azoto (ROS/RNS) (**Haunhorst P. et al., 2010**). La GSH S-transferasi (GST) catalizza la detossificazione GSH-dipendente di elettrofili e cancerogeni luminali e i livelli di espressione della GST sono spesso utilizzati come un indice di potenziale tumorigeno intestinale. L'abbondanza e l'espressione della GST intestinale sono sensibili alla dieta e all'esposizione a farmaci (**Hoensch H. et al., 2006**). Tra la famiglia multigenica umana di isoenzimi GST (**McIlwain C.C. et al., 2006**), alcune isoforme sono altamente espresse nell'intestino tenue con scarsa abbondanza nel colon (**Hoensch H. et al., 2006**), coerentemente con rari fenomeni neoplastici nell'intestino tenue (**Pool-Zobel B. et al., 2005**). La diminuzione della GST dal colon prossimale a quello distale (**Hoensch H. et al., 2006**) suggerisce una ridotta detossificazione degli xenobiotici nel colon e un aumento del rischio di cancro (**Circu M.L. and Aw T.Y., 2012**).

Le transizioni fenotipiche delle normali cellule intestinali da proliferazione a differenziazione o apoptosi sono associate con l'ossidazione crescente dell' E_h dei sistemi redox intracellulare GSH/GSSG o extracellulare Cys/CySS (**Jones D.P., 2006; Jones D.P. and Go Y.M., 2010**). Questa transizione cellulare non sembra, invece, essere correlata all' E_h della coppia Trx/TrxS (**Nkabyo Y.S. et al., 2002**).

Un ambiente redox riducente favorisce la proliferazione, un ambiente ossidato favorisce l'arresto della crescita e il differenziamento, mentre un ambiente redox estremamente ossidato si associa con le cellule in fase di apoptosi o necrosi (**Circu M.L. and Aw T.Y., 2011**). Lo stato redox del GSH/GSSG cellulare controlla la transizione cellulare da uno stato di quiescenza a uno proliferativo, di arresto della crescita, di differenziamento o apoptotico nelle cellule intestinali e in altri tipi cellulari (**Aw T.Y., 2003; Aw T.Y., 2005**).

L' E_h del GSH/GSSG intracellulare varia tra -260mV e -240mV nella proliferazione, tra -220mV e -200mV nell'arresto della crescita e nella differenziazione e tra -170mV e -150mV nell'apoptosi o necrosi (**Jones D.P., 2002**).

Modifiche simili nell' E_h della coppia redox Cys/CySS extracellulare da -80mV a -50mV sono state associate con la transizione cellulare da uno stato proliferativo a uno differenziato (**Jonas C.R. et al., 2002**).

Sebbene l' E_h di Trx/TrxSS rimanga essenzialmente immutato nella proliferazione cellulare e nel differenziamento (Nkabyo Y.S. et al., 2002), l'ossidazione di Trx1 da parte di ROS o RNS determina l'attivazione della segnalazione delle MAPKs e l'apoptosi delle cellule del colon (Sun Y. and Rigas B., 2008).

La barriera epiteliale intestinale è costantemente attaccata dagli ossidanti derivati dalla dieta e di origine endogena che possono accumularsi e alterare il controllo redox della mucosa con conseguenze deleterie (Circu M.L. and Aw T.Y., 2011). Un esempio sono i prodotti della perossidazione lipidica e gli idroperossidi organici (Knoll N. et al., 2005).

Il GSH mucosale è cruciale nell'eliminazione intestinale dei lipidi perossidati luminali e nella prevenzione del trasporto dei perossidi linfatici (Aw T.Y. and Williams M.W., 1992; Aw T.Y. et al., 1992).

Nelle cellule Caco-2, gli idroperossidi lipidici hanno indotto la proliferazione a bassi livelli e l'apoptosi a livelli elevati in associazione con la perturbazione del GSH/GSSG (Gotoh Y. et al., 2002). Questo significa che un cambiamento del risultato fenotipico può facilmente essere modulato da un imposto transitorio (Aw T.Y., 2003; Aw T.Y., 2005) o sostenuto (Noda T. et al., 2001; Gotoh Y. et al., 2002) cambiamento nel potenziale redox del GSH/GSSG, come avverrebbe durante lo stress ossidativo intestinale acuto o cronico (Circu M.L. and Aw T.Y., 2012). Nell'intestino tenue del ratto, la normale crescita epiteliale e l'apoptosi sottostanno ad un ritmo circadiano corrispondente ai periodi di alimentazione e post-prandiali dell'animale (Tabata K. and Johnson L.R., 1986; Iwakiri R. et al., 2001). Il consumo sostenuto di una dieta contenente lipidi perossidati perturba lo stato del GSH/GSSG mucosale e causa citostasi, mentre la supplementazione di GSH ripristina i normali livelli di GSH mucosale e l'attività di turnover (Tsunada S. et al., 2003a; Tsunada S. et al., 2003b). Sorprendentemente, la crescita della mucosa in seguito a massiccia resezione dell'intestino tenue è stata associata con la deplezione del GSH e uno stato ossidato del GSH/GSSG (Tian J. et al., 2007). Questo aumento di attività proliferativa può in parte essere mediato da un'elevata Cys/CySS plasmatica (Tian J. et al., 2007), coerente con l'origine di segnali di crescita redox-dipendente dalla membrana basale (Circu M.L. and Aw T.Y., 2012).

Nelle linee cellulari coloniche Caco-2 e HT-29 una perdita significativa del GSH cellulare attraverso processi ossidativi e non ossidativi è stata associata con l'apoptosi (Circu M.L. and Aw T.Y., 2011).

Il coinvolgimento dei mitocondri nell'apoptosi cellulare mediata dagli ossidanti è ormai noto (**Circu M.L. and Aw T.Y., 2008; Circu M.L. and Aw T.Y., 2010**). Il mitocondrio è un compartimento particolarmente esposto agli ossidanti (**Circu M.L. and Aw T.Y., 2012**) e il genoma mitocondriale è vulnerabile al danno ossidativo (**Chen X.J. and Butow R.A., 2005**). È stato dimostrato che la deplezione del GSH mitocondriale (mtGSH) sensibilizza le cellule al danno indotto da ossidanti (**Garcia-Ruiz C. and Fernandez-Checa J.C., 2006**) e all'apoptosi (**Circu M.L. and Aw T.Y., 2008; Circu M.L. et al., 2009; Circu M.L. and Aw T.Y., 2011**). Infatti, la perdita di mtGSH induce la variazione della permeabilità della membrana mitocondriale (**Aon M.A. et al., 2007**), l'inibizione dei complessi respiratori (**Kamga C.K. et al., 2010**), la diminuzione di ATP (**Circu M.L. et al., 2008**) e l'incrementata produzione di ROS (**Caballero F. et al., 2010**), che collettivamente portano la cellula all'apoptosi (**Armstrong J.S. and Jones D.P., 2002; Circu M.L. et al., 2008**). D'altra parte anche un danno ossidativo all'mtDNA, un'alterata trascrizione di proteine di trasporto degli elettroni, l'esagerata produzione di ROS e la diminuzione dell'mtGSH contribuiscono al danneggiamento mitocondriale e all'iniziazione dell'apoptosi (**Van Houten B. et al., 2006**). L'omeostasi del GSH nella matrice è controllata attraverso il trasporto attivo del GSH dal citosol (**Chen Z. and Lash L.H., 1998**). L'mtGSH gioca un ruolo importante nella sopravvivenza delle cellule coloniche e la sua conservazione è fondamentale per l'integrità del mtDNA (**Green R.M. et al., 2006**).

L'elevato GSSG tissutale (**Iantomasi T. et al., 1994; Holmes E.W. et al., 1998**) e/o la diminuzione della sintesi del GSH (**Sido B. et al., 1998**) sono stati correlati con la gravità dell'infiammazione mucosale o la diminuzione del contenuto di GSH mucosale nei pazienti con IBD (**Iantomasi T. et al., 1994**). Le IBD, sono caratterizzate dall'infiammazione cronica del tratto intestinale (**Yamada T. and Grisham M.B., 1991; Arndt H. et al., 1995**), nella quale l'eccessiva generazione di ROS indotta dalle cellule infiammatorie e lo stress ossidativo tissutale svolgono un ruolo centrale (**Circu M.L. and Aw T.Y., 2012**). Tuttavia, non si è ancora certi del ruolo causale della perturbazione del GSH/GSSG mucosale nella patogenesi delle IBD dato che le terapie antiossidanti con le vitamine C ed E e il GSH non hanno avuto effetto in modelli sperimentali di IBD (**Schepens M.A. et al., 2011**).

Un persistente stato di stress ossidativo tissutale è un legame comune tra infiammazione intestinale cronica e un aumento dell'incidenza del cancro (**Circu M.L. and Aw T.Y., 2012**).

L'infiammazione cronica intestinale incrementa l'incidenza del cancro e lo sviluppo del tumore è attribuito a un persistente stato di stress ossidativo e alla diminuzione dell'eliminazione dei ROS (**Circu M.L. and Aw T.Y., 2011**). Un basso contenuto di GSH e incrementati livelli di 4-idrossi-2-nonenale, malonildialdeide e 8-idrossi-2-deossiguanosina sono stati associati a tumori maligni (**Storz P., 2005; Mistry N. et al., 2008; Brigelius-Flohè R. and Kipp A., 2009**). Inoltre, la modulazione dell'attività e del livello degli enzimi GSH e/o Trx dipendenti è in grado di aumentare la proliferazione, la migrazione, le metastasi e l'evasione dall'apoptosi delle cellule tumorali (**Powis G. et al., 2000; Brigelius-Flohè R. and Kipp A., 2009**). La Trx1 elevata è stata associata alla crescita aggressiva delle cellule del tumore primario del colon-retto (**Raffel J. et al., 2003**) ed è caratteristica del tumore al colon (**Berggren M. et al., 1996**). Stati alterati delle coppie redox e/o dei sistemi redox dipendenti sono comuni nei tumori del tratto intestinale (**Circu M.L. and Aw T.Y., 2011**).

1.5 Il vino e i vitigni: Cannonau e Vermentino

Il vino (dal latino *vinum*, affine al greco οἶνος) è il prodotto della fermentazione alcolica dell'uva pigiata, fresca o leggermente appassita, o del mosto, il succo ottenuto mediante spremitura degli acini.

L'elemento di partenza nella produzione del vino è il frutto della *Vitis vinifera*, l'uva da vino, costituito da un'infruttescenza (grappolo), comprendente un certo numero di bacche (acini o chicchi) di vario colore, dal verde al giallo-dorato, al rosso, al bluastro, al nero-violaceo, portate da un complesso di ramificazione (raspo). Gli acini, che hanno una forma che va da sferica a ellittico-ovoidale, hanno una parte esterna (buccia), una mediana (polpa) e una interna (che racchiude i semi o vinaccioli).

La buccia dell'acino è la sede del colore, dei precursori degli aromi (che non si sentono degustando gli acini) e anche dei flavanoli che andranno a costituire gran parte della struttura tannica. I tannini, che possono essere responsabili, se in quantità esagerata, dell'astringenza e dell'amaro, sono dei forti antiossidanti naturali e permettono al vino di conservarsi.

A protezione della buccia c'è la pruina, sostanza cerosa che costituisce la difesa dagli agenti esterni, sia atmosferici che patogeni. La pruina è costituita da cere ed acidi grassi che sono importanti fattori di crescita per i lieviti.

La polpa dell'acino contiene una soluzione acquosa che comprende soprattutto zuccheri, acidi organici, sali minerali, composti azotati, polifenoli come acidi fenolici e composti aromatici nel caso di uve aromatiche.

I vinaccioli, i semi dell'uva, contengono una quantità maggiore di tannini rispetto alla buccia; se passano nel vino danno sensazioni astringenti (**Lanati D., 2004**).

Le operazioni enotecniche per la preparazione del vino iniziano con la vendemmia, proseguono con la preparazione del mosto e la fermentazione, la svinatura e la conservazione del vino; comprendono anche trattamenti correttivi dei mosti, della vinificazione e dei vini stessi.

La vinificazione è l'attività di produrre il vino e il complesso delle operazioni necessarie a tal fine (pigiatura, diraspatura, sgrondatura, torchiatura o pressatura, ecc.) con le quali dalle uve si ottiene il mosto e quindi il vino, dopo la fermentazione alcolica. Si distingue una vinificazione in bianco e una vinificazione in rosso. Nella vinificazione in bianco il mosto fermenta in assenza delle parti solide dell'uva (raspi, bucce e vinaccioli), e si effettua,

generalmente, per ottenere vini bianchi, da uve sia bianche che rosse; la vinificazione in rosso avviene invece con macerazione delle parti solide (vinacce), le bucce e i vinaccioli, mentre i raspi vengono, nella generalità dei casi, eliminati con la pigiatura delle uve. Si può avere, inoltre, una vinificazione in rosato che si esegue da uve nere; il mosto resta a contatto con le vinacce il tempo necessario per assumere la tonalità e l'intensità di colore desiderate.

La trasformazione del mosto in vino avviene attraverso la fermentazione alcolica condotta dai lieviti appartenenti al genere *Saccharomyces*. I lieviti trasformano gli zuccheri, glucosio e fruttosio, in alcol e anidride carbonica (**Lanati D., 2004**). La fermentazione può essere naturale, cioè operata dai microrganismi presenti naturalmente sulla superficie degli acini e che con la pigiatura vengono portati a contatto del mosto, o può essere guidata, cioè eseguita con colture di fermenti selezionati.

I primi produttori mondiali di vino sono Francia, Spagna e Italia. Alcuni vitigni italiani risalgono all'epoca greca, etrusca e romana. Il vitigno, termine con il quale si indica una specifica famiglia di *Vitis vinifera*, può derivare o da mutazioni di varietà preesistenti, o da incroci fra varietà domestiche, o fra varietà domestiche e selvatiche.

In Italia è possibile trovare moltissimi vitigni o varietà di uva. Le zone di produzione conferiscono ai vini caratteristiche specifiche che li rendono unici.

In Sardegna il vigneto è parte integrante del paesaggio. È presente quasi ovunque, dalle pianure più fertili vicino al mare sino all'alta collina e alle zone più interne. La vitivinicoltura ha sempre svolto un ruolo importante nell'economia agricola sarda. La particolare conformazione orogenetica e territoriale di questa regione consente una viticoltura moderatamente intensiva, caratterizzata da una produzione enologica di elevata qualità che in alcune aree particolarmente favorite raggiunge spesso l'eccellenza.

È quasi certo che la *Vitis vinifera* sia in Sardegna una pianta indigena, selvatica, tanto che i popoli sopraggiunti non portarono il ceppo o il sarmento, bensì l'arte dell'innesto, della coltivazione, e le tecniche di produzione e di conservazione del vino (**www.sardegnaagricoltura.it**).

Tra i vitigni autoctoni della Sardegna troviamo il Vermentino e il Cannonau.

Grazie alle sue doti di sopravvivenza in climi aridi e sassosi ed alla sua produttività, l'uva Cannonau, originaria della Spagna, si è diffusa con successo in tutto il mondo. In Sardegna la coltivazione del vitigno e la relativa zona Doc è diffusa in tutta l'isola, ma trova il suo ambiente d'elezione nelle zone più interne, in particolare l'Ogliastra. Nonostante sia

considerato un vino autoctono, non si conoscono con certezza le sue origini. Tuttavia, recentissimi studi ancora in corso, che dimostrano l'esistenza in Sardegna di pratiche enologiche sin dall'età nuragica, potrebbero far ipotizzare la presenza del Cannonau in terra sarda già al momento della dominazione spagnola, periodo cui storicamente si fa risalire la sua introduzione (www.sardegnaagricoltura.it). Sono state trovate tracce storiche documentate dal XVI secolo (Vodret A., 2003). Il Cannonau occupa il 30% della superficie vitata sarda, investendo una superficie complessiva di circa 7.500 ettari, concentrati per oltre il 70% nella provincia di Nuoro (www.sardegnaagricoltura.it).

La Denominazione di Origine Controllata lo qualifica come "Cannonau di Sardegna" (www.sardegnaagricoltura.it). Il vino Cannonau è protetto con la denominazione di origine controllata (DOC) di "Cannonau di Sardegna" dal 1972 (**Gazzetta Ufficiale - Serie Generale no. 272, 18-11-1992**) e negli ultimi anni i produttori stanno lavorando per l'aggiornamento a "denominazione di origine controllata e garantita" (DOCG) (Tuberoso C.I.G. et al., 2013).

Il Vermentino, conosciuto in Portogallo come "codega", dalla penisola iberica si è diffuso in Liguria, in Corsica, in Sardegna e, in misura minore, anche in Toscana. La Sardegna è certamente terra d'elezione per questo vitigno, che insieme al Cannonau, rappresenta l'espressione più tipica della produzione enologica regionale. Proveniente dalla penisola iberica, è arrivato in Sardegna attraverso la Corsica alla fine del 1800 e dai terreni di disfacimento granitico della Gallura in cui ha trovato il suo habitat ideale, si è poi diffuso in tutta l'isola, dove attualmente occupa una superficie di circa 2.800 ettari. Il vitigno Vermentino viene attualmente utilizzato per la DOCG "Vermentino di Gallura" e le DOC "Vermentino di Sardegna", "Alghero Vermentino frizzante" e "Cagliari Vermentino". La DOC Vermentino di Sardegna è la più estesa e ricca di vini della Sardegna e si può produrre in tutto l'ambito regionale (www.sardegnaagricoltura.it).

Sono ancora poco numerosi gli studi sulle proprietà benefiche di questi due vini. Uno studio pubblicato su *Nature* ha correlato l'alto contenuto di procianidine nel vino rosso, ottenuto dalla varietà Cannonau, attraverso lavorazione tradizionale, all'elevata longevità delle persone, in particolare gli uomini, che vivono nella provincia di Nuoro in Sardegna, che consumano regolarmente dosi moderate di questo vino (Corder R. et al., 2006). Un recente studio effettuato nei nostri laboratori ha evidenziato l'attività antiossidante della frazione fenolica del vino e delle uve Cannonau e Vermentino in diversi sistemi sperimentali *cell free* e in colture cellulari (Loru D. et al., 2011; Deiana M. et al., 2012; Loru D. et al., 2012).

L'attività antiossidante del vino rosso Cannonau è stata recentemente valutata e confermata mediante l'utilizzo di sistemi *cell free* (test DPPH, FRAP e ABTS). È stato anche dimostrato *in vitro* un effetto vasodilatatorio diretto di questo vino in anelli aortici di ratto isolati pre-contratti con norepinefrina (**Tuberoso C.I.G. et al., 2013**).

1.6 Composizione del vino

La composizione del vino è condizionata principalmente dalla composizione dell'uva, ma anche la fermentazione e la tecnologia di vinificazione giocano un ruolo molto importante, per cui è possibile ottenere vini con composizione completamente diversa dalla stessa uva.

I principali costituenti del vino sono i seguenti:

- **Acqua:** è di gran lunga il componente più importante con un contenuto compreso tra l'80 e il 90%.
- **Alcoli:**
 - *L'alcool etilico* è il principale prodotto della fermentazione alcolica. Questa può essere arrestata e in questo caso nel vino si avrà una certa quantità di "alcool svolto" insieme agli zuccheri. Moltiplicando la percentuale di zuccheri per 0,6 si ottiene la gradazione alcolica potenziale. La somma della gradazione svolta con quella potenziale dà la gradazione alcolica complessiva, utilizzata ai fini della definizione legale del vino. Quando da un vino si fanno evaporare le sostanze volatili, costituite principalmente da acqua e alcool, il complesso che rimane si chiama estratto.
 - *La glicerina* è il terzo composto per quantità presente nei vini (4-15 g/l), è un prodotto secondario della fermentazione alcolica ed in genere il suo contenuto è tanto maggiore quanto più elevata è la gradazione alcolica. La glicerina influenza notevolmente le qualità organolettiche del vino, contribuendo a determinarne la morbidezza.
 - *L'alcool metilico* è un composto molto tossico che deriva dalla demolizione enzimatica delle pectine della buccia, pertanto i vini ottenuti attraverso la vinificazione con macerazione presentano livelli più alti rispetto a quelli ottenuti con la vinificazione in bianco. I tenori che normalmente si riscontrano nei vini (20-200 mg/l) sono largamente al di sotto della soglia di tossicità.
 - *Gli alcoli superiori* vengono così chiamati in quanto presentano un numero di atomi di carbonio superiore a 2. Comprendono principalmente 1-propanolo, 2-metil-1-propanolo (alcool isobutilico), 3-metil-1-butanolo (alcool isoamilico inattivo) e 2-metil-1-butanolo (alcool isoamilico attivo). Sono prodotti secondari della fermentazione alcolica derivanti principalmente dalla degradazione degli amminoacidi. Il loro contenuto globale varia da 100 a 500 mg/l. Gli alcoli amilici

incidono negativamente sulle caratteristiche organolettiche del vino, perciò si preferisce ridurne la produzione aggiungendo al mosto sali di ammonio, che essendo la fonte di azoto più facilmente assimilabile dai lieviti viene preferita rispetto agli amminoacidi.

- ***Butilenglicole*** è un polialcole presente in tutti i fermentati quale prodotto secondario della fermentazione alcolica. Nei vini si trova in quantità comprese tra 0,3 e 0,5 g/l.
- **Zuccheri:** se la fermentazione si è completata nel vino rimane qualche frazione di grammo degli zuccheri dell'uva (fruttosio, glucosio e gli zuccheri infermentescibili quali arabinosio e xilosio).
- **Acidi organici:** gli acidi organici identificati nel vino superano la cinquantina; insieme concorrono a determinare l'acidità totale dei vini, che in Italia viene espressa in g/l di acido tartarico. L'acidità è suddivisa in acidità fissa e volatile. I principali acidi organici che compongono l'acidità fissa sono: tartarico, malico, citrico, succinico e lattico. I primi tre sono presenti nell'uva mentre il succinico è un prodotto della fermentazione alcolica ed il lattico della fermentazione malo-lattica. L'acidità volatile è costituita quasi esclusivamente da acido acetico. Questo si forma in piccole quantità durante la fermentazione alcolica.
- **Sostanze azotate:** le forme in cui sono presenti le sostanze azotate nel vino sono le stesse di quelle dell'uva, ma in quantità decisamente minori in quanto in parte utilizzate dai lieviti e in parte precipitate.
- **Sostanze fenoliche:** queste sostanze provengono direttamente dall'uva ed il loro contenuto dipende dalla tecnica di vinificazione utilizzata. Se si è utilizzata la vinificazione con macerazione il loro contenuto sia qualitativo che quantitativo dipende dalla qualità dell'uva e dal tempo di macerazione. I composti fenolici condizionano il colore, l'aroma e la stabilità del vino. Sostanze fenoliche sono anche cedute dalla botte al vino durante l'invecchiamento.
- **Sostanze minerali:** provengono direttamente dall'uva e sono costituite da cationi (K, Na, Ca, Mg, ecc.) e anioni (fosfati, solfati e cloruri), il cui contenuto complessivo nel vino è intorno ai 2-3 g/l. Sono presenti numerosi oligoelementi alcuni dei quali (ferro, iodio, cobalto, rame, manganese, molibdeno e zinco) esplicano azioni favorevoli attivando importanti processi biochimici nei processi fermentativi. Alcuni oligoelementi

(piombo, arsenico e cadmio) sono tossici e per questo sono stati fissati dei limiti massimi.

- **Sostanze aromatiche:** le sostanze aromatiche che concorrono a formare il bouquet del vino sono moltissime. Questi componenti evolvono nel tempo e sono numerosi i fattori che incidono sulla loro qualità e quantità. A grandi linee essi sono suddivisi in:
 - aromi primari o varietali
 - aromi pre-fermentativi
 - aromi fermentativi
 - aromi post-fermentativi
- **Vitamine:** provengono direttamente dall'uva e favoriscono l'azione dei lieviti. La vitamina C presente nell'uva non si ritrova nei vini in quanto scompare durante la vinificazione.
- **Gas disciolti:**
 - **Anidride carbonica:** per ogni mole di glucosio fermentata si formano due moli di anidride carbonica. Questa si scioglie in parte nei vini ed in parte si disperde durante le varie fasi tecnologiche. Nei vini giovani abbiamo tenori di CO₂ elevati, intorno ai 2g/l, che tendono a diminuire nel tempo per arrivare a 50mg/l nei vini vecchi. La presenza di CO₂ nel vino esalta il profumo e ne migliora la sapidità e il colore, inoltre lo protegge dall'ossidazione; per questo motivo è sempre più frequente l'aggiunta di CO₂, soprattutto ai vini bianchi.
 - **Ossigeno:** durante tutte le fasi della lavorazione il vino viene continuamente a contatto con l'ossigeno e può assorbirlo fino a raggiungere i 10mg/l. L'ossigeno presente nel vino partecipa ai processi ossido-riduttivi che avvengono durante l'invecchiamento. Un eccesso di ossigeno soprattutto nei vini bianchi, ne provoca l'ossidazione con risvolti negativi su aroma, gusto e colore.
 - **Anidride solforica:** sebbene esistano alcuni lieviti che possono produrre SO₂, la sua presenza nei vini è legata soprattutto all'aggiunta che si effettua per regolare la fermentazione e proteggere i vini dall'ossidazione durante la conservazione. Le quantità massime sono fissate per legge per tutelare il consumatore dai suoi effetti tossici non trascurabili

(Cabras P., 2004).

1.7 Fenoli del vino

I fenoli o composti fenolici, generalmente chiamati polifenoli, comprendono i fenoli semplici, composti che hanno un singolo anello aromatico contenente uno o più gruppi idrossilici come l'acido caffeico, e i composti polifenolici propriamente detti, che hanno molteplici anelli fenolici nella struttura come la catechina e l'acido ellagico.

Il vino contiene molte sostanze fenoliche, la maggior parte delle quali hanno origine negli acini d'uva. I composti fenolici svolgono diverse funzioni importanti nel vino che riguardano il gusto (amarezza e astringenza, specialmente nel vino rosso) e il colore del vino rosso. Inoltre, i composti fenolici sono la chiave per la conservazione del vino e la base di un lungo invecchiamento. Infine, dato che i composti fenolici ossidano facilmente, sono responsabili dell'imbrunimento del vino se esposto all'aria.

La quantità totale di fenoli trovata in un bicchiere di vino rosso è dell'ordine dei 100-200 mg contro circa 40 mg in un bicchiere di vino bianco (**Waterhouse A.L., 2002**).

I polifenoli del vino possono essere raggruppati in due categorie: i non-flavonoidi e i flavonoidi.

1.7.1 *Non-flavonoidi*

- ◆ **Acidi idrossicinnamici**: il precursore è l'acido cinnamico e sono la classe di fenoli maggiormente presente nell'uva e nel vino bianco. Sia il vino rosso che il vino bianco ne contengono livelli simili. Sono i primi ad essere ossidati e, in seguito, ad avviare il processo di imbrunimento dei vini bianchi. Negli acini sono presenti in forma di acidi idrossicinnamici semplici: acido caffeico, acido cumarico e acido ferulico. Questi composti sono presenti anche come esteri legati all'acido tartarico per formare l'acido caftarico, l'acido cutarico e l'acido fertarico rispettivamente. In natura sono per lo più glicosilati o esterificati, ma possono trovarsi legati anche alla parete cellulare per mezzo di proteine o altri polimeri. La loro azione antiossidante è data dalla capacità di formare radicali stabili: questa funzione varia in funzione del tipo, numero e posizione dei sostituenti presenti. La presenza di più gruppi ossidrilici o metossilici sull'anello aromatico conferisce agli acidi idrossicinnamici un potenziale antiossidante superiore, per la maggior capacità di stabilizzare un eventuale radicale. I livelli totali di acidi idrossicinnamici sono in genere

130 mg/l nei vini bianchi e 60 mg/l nei vini rossi (**Waterhouse A.L., 2002; Cabras P., 2004; Waterhouse A.L., 2006**).

- ◆ **Acidi idrossibenzoici:** il precursore è l'acido benzoico e sono presenti in minore quantità nei vini nuovi. Quello maggiormente presente nel vino è l'acido gallico, che deriva dall'idrolisi degli esteri gallati dei tannini idrolizzabili e di quelli condensati dopo pochi mesi di invecchiamento. Mentre il precursore acido benzoico ha scarsa attività, gli acidi idrossibenzoici, così come gli acidi idrossicinnamici, presentano proprietà antiossidanti che consentono loro di reagire con i radicali perossilici coinvolti nella fase di iniziazione e di propagazione della perossidazione lipidica. La concentrazione nel vino bianco è di circa 10 mg/l, mentre nel vino rosso è di circa 70 mg/l (**Waterhouse A.L., 2002; Cabras P., 2004; Waterhouse A.L., 2006**).
- ◆ **Tannini:** sono tra i principali costituenti del vino, in particolare di quello rosso, ottenuto per macerazione delle bucce d'uva, che ne contengono in gran quantità. I tannini, il cui termine deriva da *tannin* (quercia), hanno la capacità di chelare i metalli, precipitare le proteine ed esercitare una notevole azione antiossidante. I tannini vengono estratti dalle bucce e dai vinaccioli durante la fermentazione, ma questi composti si trovano anche nel legno, per cui la concentrazione aumenta nel vino anche durante la permanenza nelle botti o nelle *barrique*. La funzione principale dei tannini nel vino è legata al colore, infatti è la presenza di tannini e antociani a conferire le varie sfumature. Altra funzione dei tannini è quella conservante, infatti fungono da antibatterici proteggendo il vino e assicurandone la longevità. Non tutti i tannini, però, influiscono positivamente sul vino, quelli ceduti dai vinaccioli, ad esempio, conferiscono un sapore amaro. I tannini possono essere a loro volta suddivisi in condensati ed idrolizzabili. I tannini condensati sono polimeri dei flavan-3-oli; i tannini idrolizzabili comprendono gli ellagitannini, formati da glucosidi dell'acido ellagico, e i gallotannini che per idrolisi acida liberano acido gallico. I tannini idrolizzabili nel vino bianco hanno livelli di circa 100 mg/l, mentre nei vini rossi i livelli salgono a 250 mg/l dopo due o più anni di maturazione (**Waterhouse A.L., 2002; Cabras P., 2004; Waterhouse A.L., 2006**).

- ◆ **Stilbeni:** sono presenti in quantità minore nel vino rispetto alle altre sostanze fenoliche. Il principale stilbene presente nell'uva è il resveratrolo, prodotto dalla vite in risposta a infezioni e attacchi fungini (ad es. da *Botrytis cinerea*). La produzione di resveratrolo diminuisce durante la maturazione e, di conseguenza, vini ottenuti da uve mature non contengono molto resveratrolo. Il resveratrolo è presente come isomero *cis*, *trans* e come composto glucosidico. Il *cis*-resveratrolo è assente nell'uva, ma si trova nel vino (con concentrazioni di 0.5 mg/l nel vino bianco e di 7 mg/l nel vino rosso) come risultato dell'isomerizzazione del *trans* dopo esposizione alla luce (340 nm) (**Waterhouse A.L., 2002; Cabras P., 2004; Waterhouse A.L., 2006**).

1.7.2 Flavonoidi

Rappresentano un vasto gruppo di composti naturali, la cui struttura di base, illustrata in Figura 1, è rappresentata da uno scheletro di difenilpropano (C6-C3-C6), costituito da due anelli aromatici (anello A e B) uniti da una catena di tre atomi di carbonio, normalmente presenti in forma eterociclica ossigenata (D'Archivio M. et al., 2007).

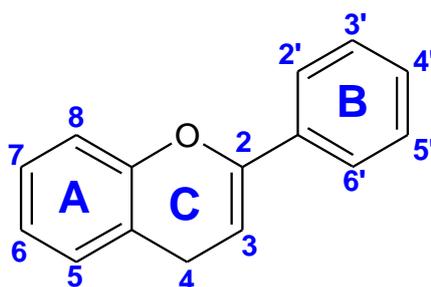


Figura 1 Struttura generale dei flavonoidi

A seconda del numero, della posizione e del tipo di sostituenti, e in base al grado di insaturazione e ossidazione della catena carboniosa, i flavonoidi possono essere suddivisi in diverse classi. Sono stati identificati più di 4000 flavonoidi e il numero è in costante crescita, in quanto i sostituenti primari (come il gruppo idrossile), possono essere sostituiti in numerosi modi, dando origine a strutture molto complesse (D'Archivio M. et al., 2007).

I flavonoidi che si trovano nelle uve e nel vino possiedono due gruppi idrossilici nell'anello A, in posizione 5 e 7. Le differenze nello stato di ossidazione e di sostituzione nell'anello C definiscono le diverse classi di flavonoidi. Ad esempio, una saturazione nell'anello C definisce la struttura dei flavani, un gruppo cheto in posizione 4 (e una insaturazione tra il 2 e il 3) definisce i flavoni, l'anello aromatico definisce le antocianidine (Waterhouse A.L., 2002).

Le sostituzioni sull'anello B definiscono i membri delle classi. Normalmente viene sostituito un idrossile in posizione 4 e un ossigeno in posizione 3 e/o 5, che può essere un idrossile (fenoli) o un metossile (Waterhouse A.L., 2002).

I flavonoidi possono essere presenti come agliconi o come glucosidi: in questo caso la molecola risulta più polare e quindi più idrosolubile, ma meno reattiva nei confronti dei

radicali liberi. Lo zucchero generalmente coinvolto nella formazione dei glucosidi è il D-glucosio, ma possono essere presenti anche altri monosaccaridi, come L-ramnosio, galattosio, xiloso, arabinosio, e disaccaridi, come il rutinosio (**Waterhouse A.L., 2002**).

Sono molecole importanti dal punto di vista organolettico perché contribuiscono al colore, sapore e aroma dei vini. Anche se non sono considerati veri e propri nutrienti, i flavonoidi sono molto studiati per le molteplici attività biologiche, importanti nella prevenzione di numerose patologie.

Il gruppo dei flavonoidi comprende la maggior parte dei fenoli presenti nel vino rosso e deriva dall'estrazione delle bucce e dei semi dell'uva, durante il processo di fermentazione (**Waterhouse A.L., 2002**).

Le principali categorie di flavonoidi presenti nel vino sono i flavonoli, flavanoli e antociani.

- ◆ **Flavonoli:** i flavonoli maggiormente presenti nel vino sono la quercetina, la miricetina e il campferolo, più facilmente ritrovabili nell'uva e nel vino come glucosidi rispetto alle forme aglicone (**Waterhouse A.L., 2002**). La biosintesi dei flavonoli è stimolata dalla luce, si accumulano quindi nel tessuto esterno del frutto; possono esistere delle differenze di concentrazione tra frutti della stessa pianta e anche tra le diverse parti di un unico frutto, a seconda dell'esposizione alla luce del sole (**Cortell J.M. and Kennedy J.A., 2006**). Nel vino rosso i flavonoli hanno una concentrazione di circa 100 mg/l.

- ◆ **Flavanoli:** rappresentano la classe più abbondante di flavonoidi presenti nel vino e nell'uva, dove si trovano nei semi e nella buccia; possiedono come nucleo base la catechina e l'epicatechina, che nelle bucce sono presenti quasi integralmente in forma polimerica. Sono spesso chiamati flavan-3-oli per indicare la posizione del gruppo alcolico nell'anello aromatico C. I flavanoli sono presenti nel vino in forma di esteri dell'acido gallico. Nel vino rosso sono maggiormente rappresentati dalla catechina e la sua concentrazione dipende dalla tecnica di produzione. La maggior parte dei composti fenolici nel vino proviene dalla condensazione di più molecole di flavanoli che danno origine agli oligomeri (procianidine) e ai polimeri (tannini condensati) (**Waterhouse A.L., 2002; Cabras P., 2004; Waterhouse A.L., 2006**).

- ◆ **Antociani:** composti chimici presenti nella buccia degli acini, il cui colore cambia con l'acidità dell'ambiente in cui si trovano. Formano dei derivati detti antocianidine, fra cui i più importanti sono la cianidina (rossa) e la delphinidina (rosso violetto). Gli antociani (dal greco *antos*=fiore e *cianos*=azzurro) e le antocianidine sono responsabili del colore rosso delle uve e del colore rosso-violetto dei vini novelli. Durante l'invecchiamento del vino si aggregano formando dei polimeri detti flavanoli i quali sono poco solubili nel vino e precipitano; per tale ragione il vino con il tempo tende a schiarirsi. Sono responsabili della colorazione del vino rosso e dei colori rosso e blu della buccia dell'uva rossa o nera. Gli antociani reagiscono con i tannini per produrre una molecola chimicamente più stabile. Il nome per il semplice anello flavonoide, ovvero per la forma non combinata con i tannini è antocianidina. Gli antociani si trovano nella forma glicosilata e gli agliconi più rappresentativi sono: cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina e malvidina. In *Vitis vinifera*, la specie europea, lo zucchero è il 3-glucosio mentre nelle specie americane è il 3,5-di-glucosio, la presenza quindi dell'uno o dell'altro zucchero fornisce indicazione sul tipo di uva usata nella produzione del vino. Il vino contiene fino a 350 mg di antociani/l, che vengono trasformati in varie strutture complesse durante la maturazione (**Brouillard R. et al., 1997; Es-Safi N.E. et al., 2002; Waterhouse A.L., 2002; Cabras P., 2004; Waterhouse A.L., 2006**).

1.8 Attività biologiche dei polifenoli: attività antiossidante e anti-infiammatoria

Tra gli antiossidanti derivati dalla dieta, i polifenoli sono i più abbondanti. Essi sono presenti naturalmente nelle verdure, nella frutta (**Giovannini C. et al., 2006; (D'Archivio M. et al., 2007)**), nei cereali e legumi secchi, nel cioccolato, nelle olive (**D'Archivio M. et al., 2007**) e nell'olio extravergine d'oliva (**Giovannini C. et al., 2006**), e nelle bevande di origine vegetale come tè, vino (**Giovannini C. et al., 2006**) e caffè (**D'Archivio M. et al., 2007**).

Nelle piante i polifenoli hanno funzioni diverse: colorante, proprietà antimicrobiche e antifungine, protezione dai raggi UV, chelazione di metalli pesanti e protezione antiossidante nei confronti di radicali liberi generati durante la fotosintesi (**Carratù B. and Sanzini E., 2005**).

Sulla base della loro assunzione giornaliera, che può raggiungere 1 g/die (in una dieta ricca di frutta e verdure) (**Kuhnau J., 1976**), notevolmente superiore rispetto a quella di altri antiossidanti (vitamina E, vitamina C, β -carotene), i polifenoli possono essere un fattore importante nell'assicurare il potenziale antiossidante della dieta e nel contribuire a mantenere l'equilibrio redox endogeno nell'uomo (**Nardini M. et al., 2009**); le concentrazioni di polifenoli nel tratto gastrointestinale possono raggiungere livelli millimolari (**Scalbert A. and Williamson G., 2000**).

Come antiossidanti i polifenoli possono proteggere i costituenti cellulari dal danno ossidativo e, quindi, limitare il rischio di insorgenza di diverse patologie degenerative legate allo stress ossidativo. Studi sperimentali, infatti, sostengono con forza un ruolo importante dei polifenoli nella prevenzione di patologie cardiovascolari, tumori, osteoporosi, diabete mellito, patologie neurodegenerative e intestinali (**Scalbert A. et al., 2005**). Sono in grado di detossificare *in vitro* le specie reattive dell'ossigeno, dell'azoto e del cloro, quali i radicali superossido e l'idrossile, l'ossigeno singoletto, i radicali perossilici, il perossinitrito e l'acido ipocloroso (**Rice-Evans C., 2001**).

Il loro potere antiossidante dipende dal numero di anelli fenolici, dal numero e posizione di gruppi idrossilici e di doppi legami presenti nella molecola, ed è determinato in particolare dalla presenza di un anello B diidrossilato (gruppo catecolico), di un'insaturazione in posizione 2,3 associata ad una funzione 4-carbonilica nell'anello C e di gruppi funzionali capaci di chelare i metalli di transizione (**Bors W. et al., 2001; Spencer J.P.E. et al., 2003**).

Le proprietà antiossidanti sono state considerate per molto tempo la principale funzione dei polifenoli (**Luximon-Ramma A. et al., 2002**), ma nei sistemi biologici complessi, i polifenoli possono avere una serie di effetti non ascrivibili alla sola attività antiossidante (**Allen R.G. and Tresini M., 2000; Kwon Y.W. et al., 2003; Torres M. and Forman H.J., 2003**).

È stato dimostrato che i polifenoli sono in grado di modulare l'espressione e/o l'attività di enzimi come le telomerasi (**Naasani I. et al., 2003**), le cicloossigenasi (**Laughton M.J. et al., 1991; O'Leary K.A. et al., 2004; Hussain T. et al., 2005**), le lipoossigenasi (**Schewe T. et al., 2001; Sadik C.D. et al., 2003**), la xantina ossidasi (**Van Hoorn D.E. et al., 2002**), le metalloproteinasi (**Isemura M. et al., 1999; Oak M.H. et al., 2004**), l'enzima di conversione dell'angiotensina (**Actis-Goretta L. et al., 2003**) e le protein chinasi (**Agullo G. et al., 1997; Gamet-Payrastre L. et al., 1999**); di interagire con le vie di trasduzione del segnale (**Kong A.N. et al., 2000; Wiseman S. et al., 2001; Spencer J.P. et al., 2003**), con i recettori cellulari (**Rosenkranz S. et al., 2002; Mueller S.O. et al., 2004**), con le vie apoptotiche caspasi-dipendenti (**Monasterio A. et al., 2004; Sergeev I.N., 2004; Way T.D. et al., 2005**), con la regolazione del ciclo cellulare (**Fischer P.M. and Lane D.P., 2000**) e con l'induzione di enzimi detossificanti (**Birt D.F. et al., 2001**). Essi inoltre sono in grado di aumentare la produzione di vasodilatatori come l'ossido nitrico (**Aldini G. et al., 2003; Wallerath T. et al., 2003**), influenzare la funzione delle piastrine (**Murphy K.J. et al., 2003**) e competere con il glucosio nel trasporto attraverso la membrana (**Vera J.C. et al., 1996**).

Dati sperimentali indicano che i polifenoli possono offrire una protezione indiretta attraverso l'attivazione di sistemi di difesa antiossidante endogeni (**Giovannini C. et al., 2006**).

Molti dati sperimentali dimostrano che sistemi cellulari, trattati con polifenoli, presentano un aumento della concentrazione di GSH e delle attività enzimatiche ad esso correlate, in particolare della γ -glutamylcisteina sintetasi, della glutatione reduttasi, della GPx e della glutatione S-transferasi (**Steele V.E. et al., 2000; Jeon S.E. et al., 2003; Molina M.F. et al., 2003; Ramirez-Mares M.V. and de Mejia E.G., 2003; Scharf G. et al., 2003; Soto C. et al., 2003**). I polifenoli sembrano agire in maniera diversa su attività enzimatiche diverse e gli effetti osservati sono fortemente dipendenti dalla struttura chimica del polifenolo e dal sistema cellulare utilizzato (**Giovannini C. et al., 2006**).

Effetti dei polifenoli sulle attività enzimatiche correlate al GSH, in particolare sulla GPx, sono stati dimostrati anche in studi *in vivo*, sia in modelli animali che nell'uomo (**Rodrigo R. et al., 2002; Khan N. and Sultana S., 2004; Fitò M. et al., 2005; Rodrigo R. et al., 2005**).

Uno dei meccanismi attraverso i quali i polifenoli esercitano tali effetti sembra essere un'azione diretta sull'espressione genica degli enzimi (**Giovannini C. et al., 2006**).

I composti fenolici hanno dimostrato di possedere anche una significativa attività anti-infiammatoria *in vitro* e *in vivo*. Dati recenti suggeriscono che i polifenoli possono funzionare come modulatori delle principali vie di trasduzione del segnale per esplicitare i loro effetti benefici. Questi composti naturali esprimono l'attività anti-infiammatoria attraverso la modulazione dell'espressione di geni pro-infiammatori come la cicloossigenasi, la lipoossigenasi, la ossido nitrico sintasi e diverse citochine, principalmente agendo attraverso il *signalling* del fattore NF- κ B e le MAPKs.

È stato suggerito che i meccanismi molecolari coinvolti nelle attività anti-infiammatorie dei polifenoli includono: l'inibizione di enzimi pro-infiammatori come le cicloossigenasi, le lipossigenasi e l'ossido nitrico sintasi inducibile attraverso l'attivazione dei recettori PPAR γ ; l'inibizione di fosfoinositide 3-chinasi (PI3-kinase), tirosina chinasi, NF- κ B e c-JUN e l'attivazione di enzimi antiossidanti detossificanti di fase II, MAPKs, protein-chinasi C (PKC), serina/treonina protein-chinasi Akt/PKB, così come la modulazione di diversi geni per la sopravvivenza cellulare/ciclo cellulare (**Santangelo C. et al., 2007**).

2 SCOPO DEL LAVORO

L'intestino, essendo un sito di interfaccia tra interno dell'organismo ed ambiente esterno, è costantemente esposto agli ossidanti derivati dalla dieta, oltre che alle specie reattive e ossidanti di derivazione endogena.

Fra gli agenti ossidanti sono particolarmente rilevanti i prodotti di ossidazione del colesterolo, gli ossisteroli, che, oltre ad essere generati endogenamente, possono essere introdotti con la dieta in quanto presenti in diversi alimenti.

Gli ossisteroli svolgono importanti funzioni fisiologiche ma mostrano anche diversi effetti dannosi tra i quali citotossicità, induzione della morte cellulare per apoptosi o necrosi, cancerogenicità ed effetti pro-ossidanti e pro-infiammatori. Recentemente è stata suggerita un'associazione di questi composti con lo sviluppo delle IBD e con un aumento del rischio di sviluppare vari tipi di tumore a livello gastrointestinale.

L'intestino possiede diversi meccanismi di difesa che possono talvolta non essere sufficienti a contrastare l'attacco cui la mucosa intestinale è continuamente esposta. L'introduzione con la dieta di sostanze antiossidanti coadiuva le difese endogene. Tra questi antiossidanti i polifenoli, presenti in verdura, frutta e bevande come il vino, sono quelli più abbondanti. Generalmente, i composti fenolici sono poco assorbiti, largamente metabolizzati e raramente raggiungono concentrazioni ematiche di rilievo. La maggior parte rimane a livello intestinale, dove è verosimile che svolgano principalmente la loro azione protettiva.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare l'azione protettiva a livello intestinale della frazione fenolica di vini ottenuti da vitigni caratteristici della Sardegna, il Cannonau (rosso) e il Vermentino (bianco), nei confronti dell'effetto tossico, pro-ossidante e pro-infiammatorio, esplicito dagli ossisteroli.

Dati ottenuti precedentemente nei nostri laboratori hanno dimostrato un'attività antiossidante degli estratti fenolici dei vini e delle uve Cannonau e Vermentino sia in sistemi sperimentali *cell free* che in colture cellulari sottoposte a stress ossidativo.

Per valutarne l'azione antiossidante ed anti-infiammatoria a livello intestinale, gli estratti fenolici sono stati testati utilizzando una coltura di cellule intestinali umane, le Caco-2, che, una volta differenziate, presentano caratteristiche morfologiche e funzionali di cellule di intestino tenue, sono, infatti, polarizzate con microvilli.

Il danno ossidativo è stato indotto trattando le cellule con una miscela di ossisteroli rappresentativa di quanto può essere ingerito con la dieta, che comprende 7-chetocolesterolo, 5 α ,6 α -epossicolesterolo, 5 β ,6 β -epossicolesterolo, 7 α -idrossicolesterolo e 7 β -

idrossicolesterolo; sono state valutate la morte cellulare, e la quantità di malonildialdeide (MDA) prodotta come indicatore di danno ossidativo.

Per avere un quadro più completo dell'azione pro-ossidante della miscela e dell'effetto degli estratti fenolici abbiamo valutato i cambiamenti dello stato redox cellulare; abbiamo determinato l'attività della glutatione perossidasi e la variazione della concentrazione di GSH. Infatti, le cellule Caco-2 differenziate possiedono, come le cellule intestinali, tutti gli enzimi antiossidanti che metabolizzano i radicali dell'ossigeno: superossido dismutasi, glutatione perossidasi, glutatione reduttasi e catalasi.

È stato riportato che nelle cellule Caco-2 differenziate la medesima miscela di ossisteroli è in grado di promuovere la generazione di ROS mediante la modulazione dell'attività dell'isoforma colonica della NOX, la NOX1.

Abbiamo quindi valutato la capacità degli estratti fenolici di vino di inibire nelle nostre condizioni sperimentali la generazione di ROS e l'attività della NOX1.

Nelle cellule Caco-2 differenziate è stata, inoltre, valutata la capacità anti-infiammatoria della frazione fenolica presente nel vino in termini di produzione di due importanti citochine pro-infiammatorie attivate dalla miscela di ossisteroli: IL-6 e IL-8.

È stato precedentemente dimostrato che la medesima miscela di ossisteroli era in grado di indurre l'espressione e la sintesi di IL-8 mediante attivazione della NOX1 e conseguente aumento di ROS.

Concentrazioni moderate di ROS intracellulari, possono agire come secondi messaggeri nell'attivare molecole di trasduzione del segnale sensibili alle alterazioni dello stato redox, quali le MAPKs ed il fattore di trascrizione NF-kB, principalmente coinvolto nella risposta infiammatoria. Contrariamente a quanto riportato per altri tipi cellulari, ad oggi non sono chiare le vie di segnale attivate dagli ossisteroli nelle cellule intestinali. Inoltre, è sempre più affermato il concetto che i polifenoli possano agire modulando le diverse vie di segnalazione cellulare ed, attraverso queste, esplicare i loro effetti benefici. Abbiamo, quindi, voluto valutare quali fossero le MAPKs elettivamente attivate dalla miscela di ossisteroli nelle Caco-2 differenziate e come gli estratti fenolici del vino potessero interferire nella loro induzione.

3 MATERIALI E METODI

3.1 Reagenti e sostanze chimiche

Tutti i solventi utilizzati, a grado di purezza analitica, sono stati acquistati dalla Merck (Darmstadt, Germania).

Il 5-cholesten-3 β ,7 α -diolo (7 α -idrossicolesterolo) e il 5-cholesten-3 β ,7 β -diolo (7 β -idrossicolesterolo) sono stati acquistati dalla Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, USA).

Il 5-colesten-3 β -ol-7-one (7- β -chetocolesterolo), il cholesterol 5 α ,6 α -epoxide (5 α ,6 α -epossicolesterolo), il cholesterol 5 β ,6 β -epoxide (5 β ,6 β -epossicolesterolo), il Neutral red, l'acido tiobarbiturico (TBA), l'acido tricloroacetico (TCA), l'acido 2- N-morfolino ethansulfonico monoidrato (MES), l'acido meta-fosforico (MPA), il tris (idrossimetil) aminometano cloridrato (tris-HCl), l'acido etilendiaminotetracetico (EDTA), il ditiotreitolo (DTT), la 2',7'-Diclorofluorescina diacetato, il Diphenyleneiodonium (DPI) e il reagente Bradford sono stati acquistati dalla Sigma Aldrich (Milano, Italia).

L'1,1,3,3- tetraetossipropano (TEP) è stato acquistato dalla Fluka (AG, Svizzera).

I kits per la misura della glutatione perossidasi "*Glutathione Peroxydase Assay kit*" e del glutatione "*Glutathione Assay kit*" sono stati acquistati dalla Cayman Chemical Company (Ann Arbor, USA).

Il kit per l'estrazione delle proteine di membrana "*Mem-PER Eukaryotic Membrane Protein Extraction Reagent Kit*" è stato acquistato dalla Thermo Scientific (Rockford, IL, USA).

I kits per la misura delle interleuchine 6 e 8 "*Human IL-6 ELISA Kit*" e "*Human IL-8 ELISA Kit*" sono stati acquistati dalla Gen-probe (France).

La Sepharose Protein A è stata acquistata dalla GE Healthcare (Milano, Italia).

Il reagente ECL e gli anticorpi primari anti-phospho-ERK1/2 e anti-total-ERK1/2 sono stati acquistati dalla Merck Millipore (Vimodrone, Milano, Italia); gli anticorpi primari anti-phospho-JNK, anti-total-JNK, anti-phospho-p38, anti-total-p38, anti-Nox1 e gli anticorpi secondari anti-mouse e anti-rabbit dalla Santa Cruz (Tebu-Bio s.r.l, Magenta, Milano, Italia); l'anticorpo primario anti-NoxA1 dalla Abcam (Cambridge, MA, USA).

I film ECL e le membrane di nitrocellulosa sono state acquistate dalla Amersham Biosciences (Chalfont St. Giles, UK).

I gel, i marker di peso molecolare, il materiale per la corsa elettroforetica e l'immunoblotting sono stati acquistati dalla Invitrogen (Milano, Italia).

Tutti gli altri reagenti e prodotti chimici sono stati utilizzati al più elevato grado di purezza.

3.2 Apparecchiature

- Microscopio Leica (Darmstadt, Germania).
- Incubatore ad anidride carbonica con camicia ad H₂O, *Steri-cycle CO₂ incubator*, model 371, Thermo Fisher scientific (USA).
- Cappa a flusso laminare *Bluebeam 4*, Blueair srl. (Capriolo BS, Italia).
- Bagno termostatico Memmert modello D-91126, Schwabach FRG (Germania).
- Lettore di micropiastre (Plate Reader) Infinite 200, Tecan (Salzburg, Austria).
- Centrifuga *Medifiger BL-S*, Selecta S.A. (Barcellona, Spagna).
- Blocco termostatico Stuart Scientific (Redhill, Surrey, Regno Unito).
- Bagno termostatico GFL modello D 3006 Vismara (Burgwedel, Germania).
- Sistema HPLC-DAD serie 1050, Hewlett Packard (Palo Alto, California).
- Colonna C-8 a fase inversa, Zorbax Eclipse XDB-C8, 150×4.6 mm, 5µm.
- Centrifuga *Iec MicroCL 17R*, Thermo Scientific (Langensfeld, Germania).
- Microscopio confocale laser (LSM 510, Carl Zeiss SpA, Arese, Milano, Italia), dotato di un obiettivo 40x/0,75.

3.3 Preparazione degli estratti fenolici di vino

Gli estratti fenolici di vino sono stati preparati e caratterizzati dal Dott. Carlo Tuberoso del Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, con una metodica di estrazione simile a quella descritta da Hollecker et al. (Hollecker L. et al., 2009), utilizzando campioni di vino gentilmente donati dalle Cantine Argiolas.

100 ml di vino sono stati sottoposti ad estrazione liquido/liquido in imbuto separatore per 4 volte con 40 ml di EtOAc. Dopo aver allontanato il solvente con il rotavapor, il residuo ottenuto è stato solubilizzato in 3 ml di MeOH e filtrato su filtro millipore 0,2 µm. Da questa soluzione sono stati prelevati 0,5 ml per le analisi su HPLC/MS e il resto dell'estratto è stato portato a secco in evaporatore rotante. Il residuo è stato mantenuto una notte sotto vuoto spinto.

La composizione degli estratti di vino utilizzati è riportata in Tabella 1 (antociani, presenti solo nel vino Cannonau) e in Tabella 2 (flavonoidi e non flavonoidi).

Composto	vino Cannonau
	µg/mg estratto
Delfinidina-3-O-glucoside	0.03
Cianidina-3-O-glucoside	< 0.01
Petunidina-3-O-glucoside	0.12
Peonidina-3-O-glucoside	0.18
Malvidina-3-O-glucoside	4.74
Delfinidina-3-O-acetilglucoside	0.01
Cianidina-3-O-acetilglucoside	< 0.01
Petunidina-3-O-acetilglucoside	0.01
Delfinidina-3-O-p-cis-cumarilglucoside	< 0.01
Cianidina-3-O-p-cis-cumarilglucoside	< 0.01
Peonidina-3-O-acetilglucoside	0.08
Delfinidina-3-O-p-trans-cumarilglucoside	0.05
Malvidina-3-O-cis-caffeoilglucoside	< 0.01
Malvidina-3-O-acetilglucoside	1.73
Cianidina-3-O-p-trans-cumarilglucoside	0.03
Malvidina-3-O-trans-caffeoilglucoside	0.12
Petunidina-3-O-p-cumarilglucoside	0.15
Peonidina-3-O-cis-p-cumarilglucoside	< 0.01
Malvidina-3-O-cis-p-cumarilglucoside	< 0.01
Peonidina-3-O-trans-p-cumarilglucoside	1.30
Malvidina-3-O-trans-p-cumarilglucoside	14.82
Totale	23.39

Tabella 1 Concentrazione degli antociani, espressi in µg/mg di estratto, presenti nell'estratto di vino Cannonau.

Composto	vino Cannonau	vino Vermentino
	µg/mg estratto	µg/mg estratto
Fenoli non flavonoidi		
<i>Acidi idrossibenzoici</i>		
Acido gallico	11,316	0,384
Acido protocatecuico	< 0,01	< 0,01
Acido 4-OH-benzoico	< 0,01	< 0,01
Acido vanillico	< 0,01	< 0,01
Acido siringico	0,282	< 0,01
Acido sinapico	< 0,01	< 0,01
Etil gallato	2,402	0,087
Metil gallato	< 0,01	< 0,01
<i>Acidi idrossicinnamici</i>		
Acido trans-caffeico	8,519	0,670
acido trans-p-cumarico	1,542	0,162
Acido trans-ferulico	0,118	< 0,01
Acido trans-caftarico *	16,370	2,373
Acido trans-cutarico *	26,980	0,921
Acido trans-fertarico *	14,375	3,369
<i>Stilbeni</i>		
trans-resveratrolo	0,333	0,010
t-resveratrolo-3-O-glucoside**	0,505	0,074
cis-resveratrolo-3-O-glucoside**	< 0,01	< 0,01
cis-resveratrolo*	0,398	0,035
Fenoli non flavonoidi TOTALI	83,139	8,085
Fenoli flavonoidi		
<i>Flavanoli</i>		
Catechina	8,665	0,661
Epicatechina	3,470	0,252
Epicatechina gallato	< 0,01	< 0,01
Procianidina B1	7,531	0,159
Procianidina B2	1,673	0,065
Procianidina trimero 1+2+3 **	1,311	0,025
Procianidina 1 **	0,405	< 0,01
Procianidina dimero 1+2 **	< 0,01	< 0,01
Procianidina trimero 4 **	0,708	0,013
Procianidina trimero 5 **	0,001	< 0,01
Procianidina dimero 3 **	< 0,01	< 0,01
Procianidina 2 **	0,415	0,023
Procianidina trimero 6 **	< 0,01	< 0,01
Procianidina dimero 4 **	< 0,01	< 0,01
Procianidina 3 **	0,098	< 0,01
Procianidina trimero 7 **	0,021	< 0,01
Procianidina dimero 5 **	< 0,01	< 0,01
Procianidina dimero 6 **	0,022	< 0,01
<i>Flavonoli</i>		
Quercetina-3-O-galattoside	< 0,01	< 0,01
Rutina	0,009	< 0,01
Quercetina-3-O-glucoside	0,030	< 0,01
Quercetina-3-O-ramnoside	0,029	< 0,01
Kampferolo-3-O-glucoside	< 0,01	< 0,01
Isorammetina-3-O-rutinoside	0,017	< 0,01
Miricetina	4,308	0,197
Quercetina	4,069	0,606
Kampferolo	1,677	< 0,01
Miricetina-3-O-glucuronide ***	0,066	< 0,01
Miricetina-3-O-glucoside ***	0,983	< 0,01
Astilbina ***	0,302	0,040
Quercetina-3-O-glucuronide ***	1,600	< 0,01
Kampferolo-3-O-galattoside ***	0,018	< 0,01
Fenoli flavonoidi TOTALI	37,429	2,039
TOTALE	120,569	10,124

(*) mg equivalenti di Acido gallico

(**) mg equivalenti di Procianidina B2

(***) mg equivalenti di Quercetina-3-O-glucoside

Tabella 2 Concentrazione dei flavonoidi e non flavonoidi, espressi in µg/mg di estratto, presenti negli estratti di vino Cannonau e vino Vermentino.

3.4 Colture cellulari

La linea cellulare Caco-2 è stata acquistata dalla ECACC (Salisbury, Witshire Regno Unito). Il terreno *Dulbecco's modified eagle medium* (D-MEM), il siero fetale bovino, la soluzione penicillina-streptomicina, il *Phosphate-Buffered Saline* (PBS) e la trispina-EDTA sono stati acquistati dalla Invitrogen (Milano, Italia).

3.4.1 Mantenimento delle colture cellulari

Le cellule CaCo-2 sono state coltivate in fiasche di coltura T-75 in 20 ml di terreno D-MEM contenente il 10% di siero fetale bovino, l'1% di soluzione penicillina (100 U/ml)-streptomicina (100 µg/ml). Le subcolture sono state preparate staccando le cellule con una soluzione all'1% di trispina-EDTA e mantenute in coltura a 37°C, in un'atmosfera al 5% di CO₂.

In vista dei trattamenti, le cellule sono state seminate in piastre da 24 pozzetti (0,5 ml) ad una densità di 1×10^5 cellule/ml, in piastre da 6 pozzetti (2 ml) e in piastre petri da 3 cm di diametro (2 ml) con densità 5×10^4 cellule/ml, in piastre petri da 9 cm di diametro (10 ml) con densità 1×10^5 cellule/ml e in fiasche T25 (5ml) ad una densità di 25×10^4 cellule/ml.

Le cellule sono state mantenute in coltura e fatte crescere e differenziare per 20-22 giorni, sostituendo il terreno di coltura due o tre volte alla settimana.

3.5 Citotossicità nelle cellule Caco-2 differenziate

Per valutare la citotossicità della miscela di ossisteroli e la capacità degli estratti fenolici di vino Cannonau e Vermentino di proteggere le cellule intestinali Caco-2 differenziate dalla citotossicità indotta dagli ossisteroli, le cellule sono state coltivate in piastre da 24 pozzetti con terreno di coltura completo. In una prima serie di esperimenti, dopo aver raggiunto la confluenza ed essersi differenziate, il terreno è stato sostituito con terreno completo al 2,5 % di siero e le cellule sono state incubate per 24 ore a 37°C con concentrazioni crescenti (7,5-480 µM) della miscela di ossisteroli in etanolo; un equivalente volume di etanolo è stato aggiunto nelle cellule di controllo.

La composizione percentuale della miscela di ossisteroli utilizzata era 7-chetocolesterolo (7K) 42,96%, 5 α -6 α -epossicolesterolo (α -epossi) 32,3%; 5 β -6 β -epossicolesterolo (β -epossi) 5,76%; 7 α -idrossicolesterolo (7 α -OH) 4,26% e 7 β -idrossicolesterolo (7 β -OH) 14,71% (**Plat J. et al., 2005**). La concentrazione della miscela di ossisteroli è stata calcolata usando un peso molecolare medio di 403 g/mol (**Biasi F. et al., 2013a**).

In un'altra serie di esperimenti, dopo aver raggiunto la confluenza ed essersi differenziate, le cellule sono state incubate per 24 ore a 37°C con quantità crescenti (2,5-25 µg/ml) degli estratti fenolici di vino Cannonau e Vermentino in soluzione metanolica; un equivalente volume di metanolo è stato aggiunto nelle cellule di controllo.

Dopo sostituzione del terreno con terreno completo al 2,5 % di siero, le cellule sono state incubate con la concentrazione di 240 µM della miscela di ossisteroli (o un equivalente volume di etanolo nel gruppo dei controlli) a 37°C per ulteriori 24 ore. Successivamente è stato prelevato il terreno per effettuare la valutazione della capacità antiossidante dei composti, attraverso la misura dell'MDA mediante il *test* del TBARS. Dopo un'ulteriore sostituzione del terreno è stata valutata la vitalità cellulare mediante il test del Neutral Red.

3.5.1 Metodica del Neutral Red.

Il *test* del Neutral Red è un metodo colorimetrico che misura la vitalità cellulare attraverso l'assorbimento del colorante Neutral Red (Basic Red 5, Toluylene Red) (**Borenfreund E. and Puerner J.A., 1984**). Le cellule vitali sono in grado di assorbire il colorante per trasporto attivo e incorporarlo nei lisosomi; le cellule non vitali, invece, non sono in grado di farlo.

L'incorporazione del colorante nelle cellule dipende dal loro numero e dal loro stato fisiologico.

Dopo il pretrattamento con gli estratti e/o il trattamento con la miscela di ossisteroli, le cellule sono state incubate per 30 minuti a 37°C in presenza di una soluzione di Neutral Red 0,33% in PBS, pari al 10% del volume del mezzo di coltura (50 µl in 500 µl di terreno).

Al termine dell'incubazione il terreno è stato eliminato, le cellule sono state lavate con PBS ed è stato aggiunto 1 ml della soluzione di solubilizzazione (CH₃COOH 1%, H₂O 49% ed EtOH 50%), che ha permesso di liberare il colorante incorporato dalle cellule. Si è quindi proceduto alla lettura spettrofotometrica a 540 nm.

3.6 Determinazione della produzione di malonildialdeide (MDA)

3.6.1 Metodica del TBARS.

Come indice del danno ossidativo è stata considerata la formazione di malonildialdeide (MDA). L'MDA è stata misurata mediante il test del TBARS, con lettura in HPLC, secondo il metodo descritto da Templar et al (**Templar J. et al., 1999**) lievemente modificato.

Ad un'aliquota di 400 µl di terreno, prelevata al termine del periodo di incubazione con la miscela di ossisteroli, come precedentemente descritto, sono stati aggiunti 100 µl di TCA al 10%. I campioni sono stati agitati e fatti riposare per 20 minuti, al termine dei quali sono stati aggiunti 200 µl di TBA allo 0,6%. Successivamente i campioni sono stati agitati e quindi incubati a 90°C per 45 minuti per favorire la formazione dell'addotto MDA-TBA che sviluppa una colorazione rosa.

Dopo raffreddamento a 0°C sono stati centrifugati per 10 minuti a 12000 rpm, e 50 µl di surnatante sono stati iniettati in HPLC. La curva standard è stata preparata usando una soluzione di tetraetossipropano (TEP), utilizzando un range di concentrazioni compreso tra 0,05 e 10µM.

3.6.2 Analisi in HPLC

La quantificazione dell'MDA è stata eseguita in HPLC con un rivelatore a serie di diodi. I campioni sono stati analizzati utilizzando una colonna C-8 a fase inversa e come fase mobile una miscela costituita dal 65% di KH₂PO₄ 50 mM a pH 7 e dal 35% di MeOH, ad un flusso di 1 ml/minuto.

L'addotto MDA-TBA è stato rivelato a 532 nm e quantificato utilizzando una curva di calibrazione lineare, con un coefficiente di correlazione > 0,995.

3.7 Valutazione dell'attività della glutazione perossidasi (GPx)

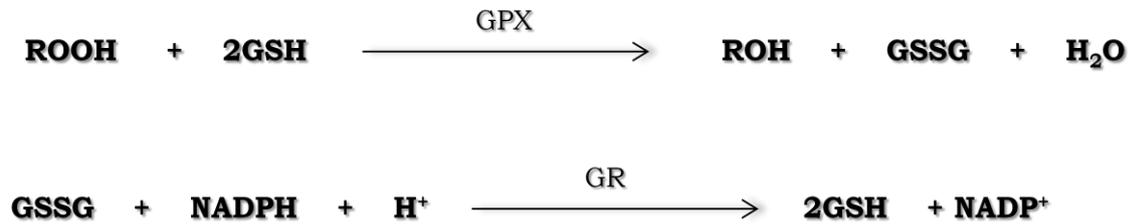


Figura 2 Schema riassuntivo dell'attività della GPx e della glutazione reduttasi (GR).

Per la misura della GPx è stato utilizzato un kit commerciale, che si basa sulla determinazione spettrofotometrica del NADP^+ , generato nella miscela di reazione secondo le reazioni riportate in Figura 2.

Per l'analisi della GPx le cellule sono state seminate in piastre da 6 pozzetti e fatte crescere per circa 20 giorni. In seguito, in una prima serie di esperimenti le cellule sono state trattate con la miscela di ossisteroli $240 \mu\text{M}$ per diversi tempi (6-36 ore), mentre in un'altra serie di esperimenti sono state pre-trattate 30 minuti con quantità crescenti degli estratti ($5-25 \mu\text{g/ml}$) e successivamente trattate con la miscela di ossisteroli $240 \mu\text{M}$ per 18 ore, in terreno completo al 2,5 % di siero. Al termine del periodo di incubazione è stato eliminato il terreno, le cellule sono state lavate con PBS per poi essere staccate con 1 ml di PBS e centrifugate a $1700 \times g$ per 10 minuti a 4°C . Il pellet cellulare ottenuto è stato risospeso con un buffer freddo costituito da Tris-HCl (50 mM), EDTA (5 mM) e DTT (1 mM). I campioni sono stati poi agitati e centrifugati a $10.000 \times g$ per 15 minuti a 4°C . Il surnatante ottenuto è stato rimosso e utilizzato per effettuare l'analisi dell'attività enzimatica tramite il kit commerciale.

La lettura è stata effettuata al *plate-reader* utilizzando la lunghezza d'onda di 340 nm.

3.8 Determinazione del glutatione (GSH)

La quantificazione del GSH è stata effettuata per reazione tra i gruppi sulfidrilici del GSH e il DTNB (acido 5,5'-ditio-*bis*-2-nitrobenzoico), mediante un kit commerciale, che prevede la determinazione spettrofotometrica del composto ottenuto, il TNB (acido 5-tio-2-nitrobenzoico).

Per questo *test*, le cellule Caco-2 sono state seminate in piastre petri da 9 cm di diametro e dopo circa 20 giorni utilizzate per i trattamenti. In una prima serie di esperimenti le cellule sono state trattate con la miscela di ossisteroli 180 μM per diversi tempi (30 minuti-24 ore). In un'altra serie di esperimenti le cellule sono state pre-trattate con quantità crescenti degli estratti in soluzione metanolica (5-25 $\mu\text{g/ml}$) in terreno completo al 2,5 % di siero per 30 minuti. Al termine del pre-trattamento le cellule Caco-2 sono state trattate con la miscela di ossisteroli (180 μM in EtOH) per 30 minuti. In seguito è stato eliminato il terreno dai pozzetti ed è stato effettuato un lavaggio con PBS. Le cellule sono state staccate con il *cell scraper* con 1 ml di PBS, raccolte in eppendorf e centrifugate a 1700 x g per 10 minuti a 4 °C. Dopo l'eliminazione del surnatante, al pellet cellulare è stato addizionato 1,5 ml di buffer freddo (50 mM di MES a pH 6-7 e 1 mM di EDTA).

I campioni sono stati agitati e sonicati per 10 minuti e, in seguito, centrifugati a 10.000 x g per 15 minuti a 4 °C. Successivamente sono stati prelevati 600 μl di surnatante, a cui sono stati aggiunti 600 μl di reagente MPA per la deproteinizzazione del campione.

Questa procedura è stata effettuata per diminuire la concentrazione delle proteine nel campione che potrebbero falsare il risultato per la presenza dei loro gruppi sulfidrilici.

Dopo questa procedura, i campioni sono stati centrifugati e il surnatante ottenuto è stato utilizzato per effettuare l'analisi del GSH tramite il kit commerciale.

La lettura è stata effettuata al *plate-reader* utilizzando la lunghezza d'onda di 405 nm.

3.9 Determinazione della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS)

È stata valutata la capacità degli estratti fenolici di vino Cannonau e Vermentino di inibire la formazione di ROS indotta dalla miscela di ossisteroli nelle cellule intestinali Caco-2.

Il metodo utilizzato si basa sulle capacità dei ROS di modificare l'assorbanza o le proprietà fluorescenti di uno specifico substrato, come la 2,7-diclorofluoresceina diacetato (DCFH-DA).

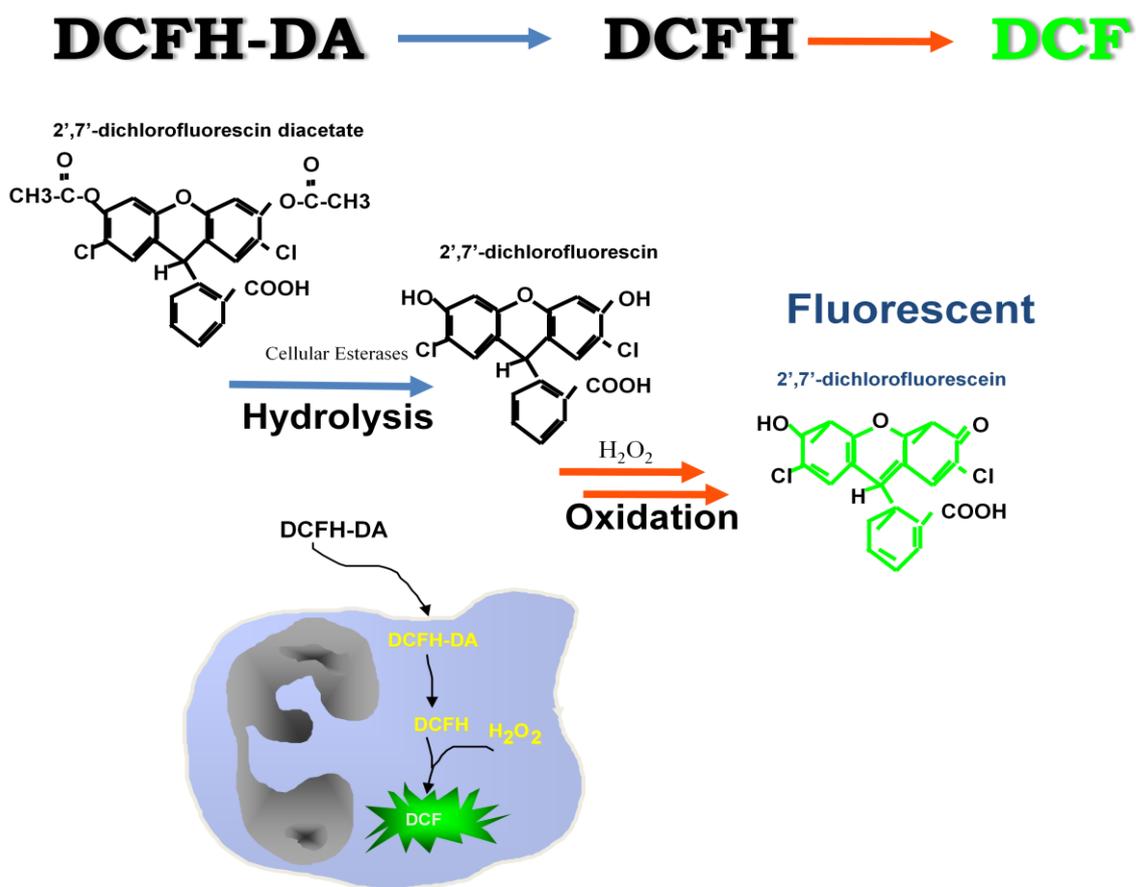


Figura 3 Schema relativo alla emissione di fluorescenza della DCFH-DA in seguito ad ossidazione ad opera dei ROS (in particolare H_2O_2) intracellulari.

La DCFH-DA è una molecola non polare che diffonde facilmente all'interno delle cellule e viene idrolizzata dalle esterasi intracellulari, che ne rimuovono i gruppi acetati, rendendola polare e quindi impermeabile. Il nuovo composto polare DCFH viene ossidato a livello

intracellulare dai ROS dando origine alla formazione di DCF (2,7-diclorofluoresceina), una molecola altamente fluorescente che emette ad una lunghezza d'onda di 532 nm (Figura 3) **(Hipler U.C. et al., 2002)**. Dati recenti indicano che l'ossidazione di DCFH è dovuta principalmente al perossido di idrogeno o a perossidasi a basso peso molecolare, entrambi generati dalle cellule; per questo motivo l'intensità di fluorescenza emessa viene considerata proporzionale alla quantità di H₂O₂ prodotta dalle cellule.

Nel nostro sistema sperimentale le cellule Caco-2 sono state seminate in piastre petri da 3 cm di diametro e fatte crescere e differenziare per 20-22 giorni in terreno completo. Successivamente le cellule sono state pre-trattate per 1 ora a 37°C con la concentrazione di 25µg/ml degli estratti fenolici di Cannonau e Vermentino, utilizzando terreno completo al 2,5% di siero. In seguito è stata addizionata la miscela di ossisteroli (60 µM in EtOH) per 30 minuti a 37 °C. Successivamente il terreno è stato eliminato e sostituito con il PBS. In seguito è stata addizionata la DCFH-DA (10 µM in EtOH). Dopo 30 minuti di incubazione a 37°C il PBS è stato eliminato e sostituito con PBS per effettuare la lettura al microscopio confocale, utilizzando la lunghezza d'onda di eccitazione 488 nm e di emissione 515 nm.

3.10 Valutazione dell'attività della NADPH OSSIDASI 1 (NOX1)

La modulazione da parte degli estratti fenolici di vino Cannonau e Vermentino dell'attività della NADPH ossidasi 1 (NOX1) indotta dalla miscela di ossisteroli è stata valutata in cellule Caco-2 differenziate.

Le cellule sono state seminate in fiasche T 25 e fatte crescere e differenziare per 20-22 giorni in terreno completo. Successivamente sono state pre-trattate per 1 ora con gli estratti fenolici di vino (25 µg/ml) e trattate con la miscela di ossisteroli (60 µM) per 30 minuti in terreno completo al 2,5% di siero. Al termine del trattamento le cellule sono state staccate con la tripsina, raccolte mediante centrifugazione a 1000 rpm per 10 minuti e lavate con PBS. Dopo ulteriore centrifugazione a 1000 rpm per 10 minuti il surnatante è stato eliminato e il pellet è stato utilizzato per effettuare l'estrazione delle proteine di membrana mediante l'utilizzo di un kit.

Dopo aver quantificato le proteine utilizzando la metodica del Bradford (**Bradford M.M., 1976**), 100µg delle proteine di membrana sono state immunoprecipitate *overnight* a 4°C con l'anticorpo anti-Nox1 e successivamente purificate con la Sepharose Protein A. I campioni sono stati denaturati in Laemmli buffer bollente [Tris-HCl 200 mM pH 7.4, glicerolo 36% (v/v), SDS 7% (p/v), 2-mercaptoetanol 1 M, blu di bromofenolo 0,1% (p/v)], separati mediante SDS-PAGE (gel di acrilamide 10%) e successivamente trasferite su una membrana di nitrocellulosa. Dopo la saturazione dei siti di legame aspecifici con latte magro in polvere al 5% in TBS/Tween 0,05% (p/v), la membrana è stata incubata *overnight* a 4°C con l'anticorpo primario anti-NoxA1 (1:200) e successivamente con l'anticorpo secondario HRP-coniugato anti-mouse (1:1000). La chemiluminescenza è stata rilevata mediante l'utilizzo del kit ECL-plus.

Per l'analisi densitometrica è stato utilizzato il software ImageJ. Il peso molecolare delle bande è stato determinato in rapporto ai markers di peso molecolare separati elettroforeticamente insieme ai campioni.

3.11 Valutazione della sintesi di interleuchina 6 (IL-6) e interleuchina 8 (IL-8)

Per valutare la modulazione della sintesi delle interleuchine 6 e 8 indotta dalla miscela di ossisteroli e la capacità degli estratti fenolici di vino Cannonau e Vermentino di prevenire questo effetto nelle cellule intestinali Caco-2 differenziate, le cellule sono state seminate in fiasche T 25 e fatte crescere e differenziare per 20-22 giorni in terreno completo.

In una prima serie di esperimenti le cellule sono state trattate per 24 ore a 37°C con la miscela di ossisteroli (30 o 60 µM) o con un corrispondente volume di etanolo (controlli). In un'altra serie di esperimenti le cellule sono state incubate per 30 minuti in presenza di DPI (5 µM) e successivamente trattate con la miscela di ossisteroli (60 µM) per 24 ore. Infine, in un'altra serie di esperimenti le cellule sono state pretrattate per 1 ora con gli estratti fenolici (25 µg/ml) e trattate per 24 ore con la miscela di ossisteroli (60 µM). Al termine del trattamento il terreno è stato prelevato e centrifugato a 140 x g per 10 minuti e il surnatante è stato utilizzato per quantificare i livelli di IL-6 e IL-8 mediante kit ELISA.

La lettura è stata effettuata mediante un lettore di micropiastre leggendo l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 450 nm e utilizzando come riferimento l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 550 nm.

I valori ottenuti sono stati analizzati mediante un programma per la statistica SlideWrite Plus software (Advanced Graphics Software).

La concentrazione delle proteine totali è stata misurata utilizzando la metodica del Bradford (**Bradford M.M., 1976**).

3.12 Modulazione dei segnali intracellulari

3.12.1 *Trattamento delle cellule*

Le cellule sono state seminate in piastre multipozzetto da 6 e fatte crescere e differenziare per 20-22 giorni in terreno completo. In una prima serie di esperimenti le cellule sono state incubate con la miscela di ossisteroli 60 μM per diversi tempi (30 minuti-4 ore). In una serie successiva di esperimenti sono state pretrattate con gli estratti di Cannonau e Vermentino (25 $\mu\text{g/ml}$) per 1 ora a 37°C e trattate per 2 ore con la miscela di ossisteroli 60 μM in terreno completo al 2,5% di siero.

3.12.2 *Estrazione e quantificazione delle proteine*

Dopo il periodo di incubazione le cellule sono state lisate dall'aggiunta di 200 μl di una soluzione tampone per l'estrazione delle proteine (Tris base 50 mM, Triton X-100 (1:100 v/v), EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, NaCl 150 mM, cocktail di inibitori delle proteasi (1:100 v/v), PMSF 0,5 mM, Sodio orto vanadato 1mM, Sodio pirofosfato 5 mM e Sodio fluoridato 50 mM). Le cellule lisate sono state raccolte, incubate in ghiaccio per 45 min e centrifugate a 12000 rpm a 5°C per 5 min ed è stato recuperato il surnatante. Per la quantificazione delle proteine nei lisati è stato utilizzato il metodo di Bradford (**Bradford M.M., 1976**) e la tecnica di Western blotting.

Per la determinazione di ERK sono stati utilizzati 20 μg di proteine, mentre, nel caso di JNK e p38, 50 μg di proteine sono state immunoprecipitate *overnight* a 4°C con l'anticorpo primario anti-JNK o anti-p 38 α/β e successivamente purificate con la Sepharose Protein A.

I campioni sono stati incubati per 10 min a 70°C in presenza di una soluzione tampone denaturante (Tris base 62.5 mM pH 6.8, SDS 2%, 2-mercaptoetanolo 5%, glicerolo 10% e blu di bromofenolo 0,0025%), separate mediante elettroforesi su gel di SDS-acrilamide (10% per ERK, 12% per JNK, 10% per p38) e successivamente trasferite su una membrana di nitrocellulosa. Dopo saturazione dei siti di legame aspecifici con latte al 5% in TBS/Tween 0,05% (p/v), le membrane sono state incubate con anticorpi anti-MAP chinasi: phospho ERK 1/2 (1:2000, overnight 4°C), total ERK1/2 (1:2000, overnight 4°C), phospho JNK (1:500, 2h a temperatura ambiente), total JNK (1:500, 2h a temperatura ambiente), phospho p38 (1:500, 2h

a temperatura ambiente), total p38 (1:500, 2h a temperatura ambiente) in TBS/Tween 0,05% (p/v) contenente 5% di latte in una piastra rotante. Successivamente sono state incubate con l'anticorpo secondario HRP-coniugato anti-mouse (1:1000 per phospho JNK; 1:5000 per phospho p38; 1:4000 per total p38 2 ore a temperatura ambiente) o anti-rabbit (1:2000, 45 min a temperatura ambiente per phospho e total ERK; 1:1000 per total JNK 1 ora a temperatura ambiente) in TBS/Tween 0,05% (p/v) contenente 5% di latte in una piastra rotante. Per la rilevazione della chemiluminescenza è stato utilizzato il kit ECL-plus.

Le bande sono state analizzate utilizzando il software ImageJ. Il peso molecolare delle bande è stato determinato in rapporto ai markers di peso molecolare separati elettroforeticamente insieme ai campioni.

3.13 Analisi statistiche

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando le medie \pm deviazione standard, tramite il programma GraphPAD INSTAT (GraphPAD software; San Diego, Ca, USA), di valori ottenuti per ciascun gruppo in almeno tre esperimenti indipendenti. Per determinare se le differenze misurate tra i diversi gruppi fossero significative, è stata effettuata l'analisi della varianza "one way ANOVA".

4 RISULTATI

4.1 CITOTOSSICITA' DELLA MISCELA DI OSSISTEROLI E ATTIVITA' PROTETTIVA DEGLI ESTRATTI FENOLICI DI VINO

Le colture cellulari di Caco-2 differenziate sono state utilizzate per valutare l'attività citotossica della miscela di ossisteroli e testare l'attività protettiva degli estratti fenolici di vino Cannonau e Vermentino.

La vitalità cellulare è stata misurata mediante il test del *Neutral Red* ed espressa come percentuale di vitalità rispetto al controllo (100% di vitalità).

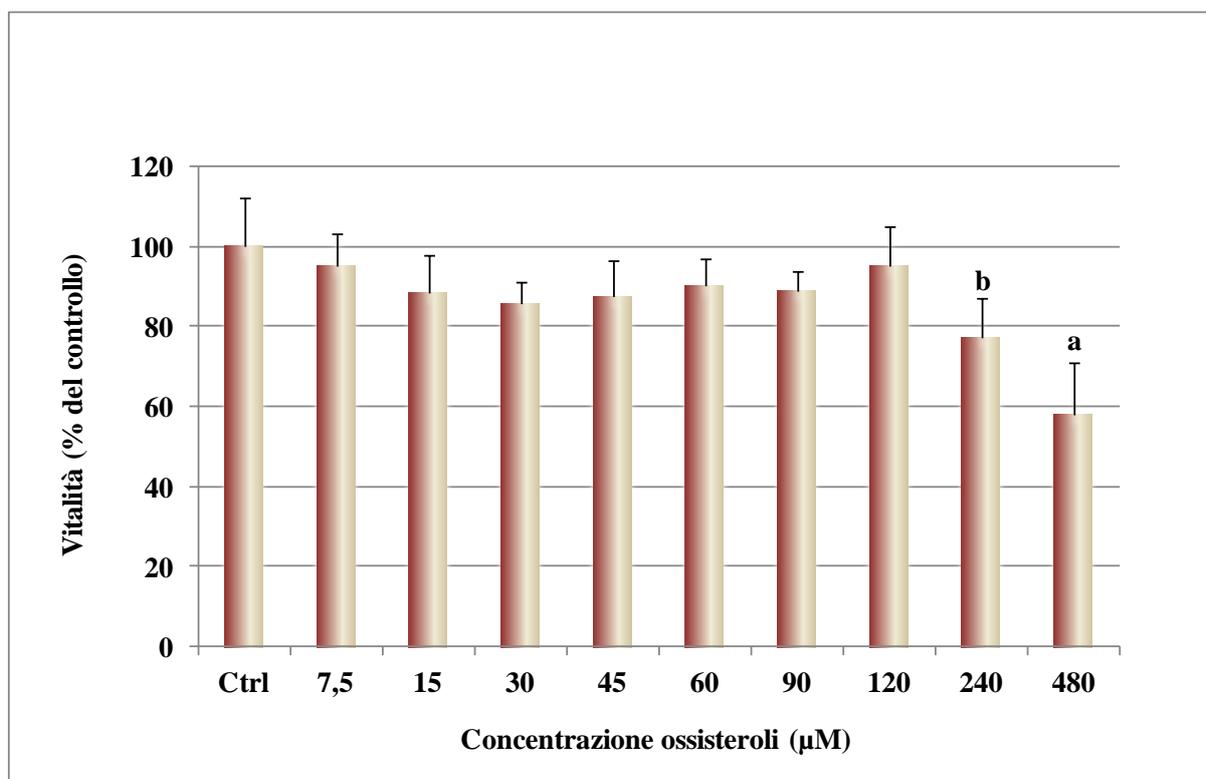


Figura 4 Percentuale di vitalità rispetto al controllo delle cellule Caco-2 incubate per 24 ore in presenza di diverse concentrazioni (7,5-480 µM) della miscela di ossisteroli. a= $p < 0,001$ e b= $p < 0,01$ verso il controllo (n=12)

In Figura 4 viene mostrata la percentuale di vitalità di cellule Caco-2 incubate per 24 ore con concentrazioni crescenti della miscela di ossisteroli (7,5-480 µM). In presenza della miscela, si può osservare una diminuzione della percentuale di vitalità rispetto al controllo che risulta significativa solo ad alte concentrazioni a partire da 240 µM.

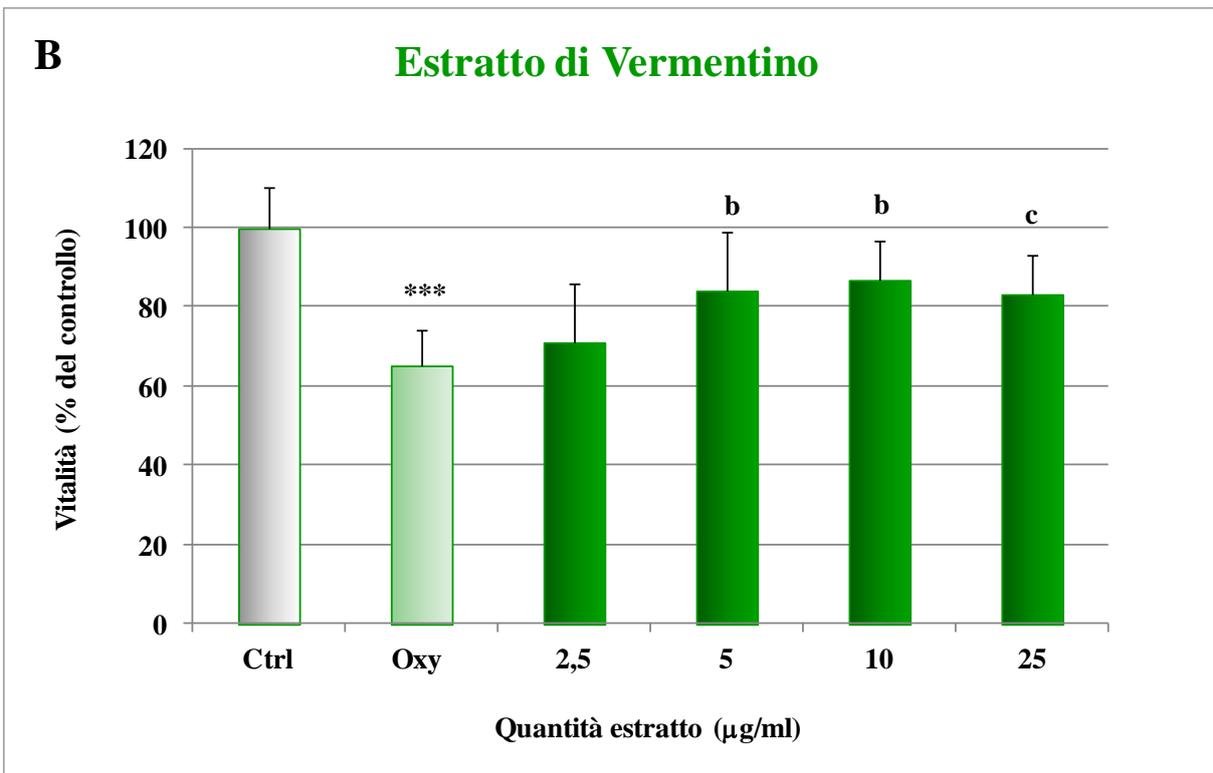
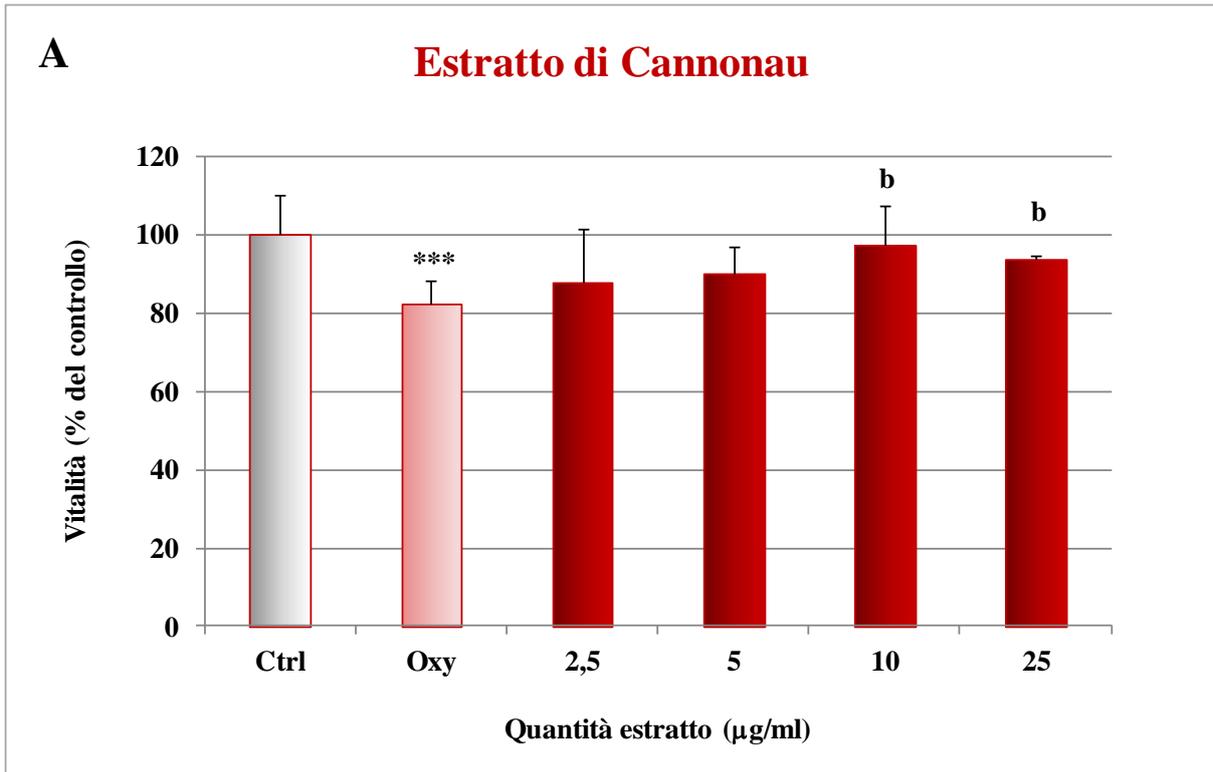


Figura 5 Percentuale di vitalità rispetto al controllo delle cellule Caco-2 pretrattate per 24 ore con diverse quantità (2,5-25 µg/ml) di estratto fenolico di vino Cannonau (A) o di vino Vermentino (B) e trattate per 24 ore con la miscela di ossisteroli (240 µM).

***= $p < 0,001$ verso il controllo; b= $p < 0,01$ e c= $p < 0,05$ verso l'ossidato (Oxy) (n=12)

Per valutare la capacità protettiva degli estratti fenolici di vino, le cellule sono state quindi pretrattate con quantità crescenti (2,5-25 $\mu\text{g/ml}$) non citotossiche (dati non mostrati) di estratto fenolico di vino Cannonau o di vino Vermentino per 24 ore e trattate con la miscela di ossisteroli (240 μM) per altre 24 ore.

L'estratto fenolico di Cannonau è stato in grado di inibire significativamente la citotossicità degli ossisteroli a partire dalla quantità di 10 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 5A), mentre l'estratto fenolico di vino Vermentino a partire dalla quantità di 5 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 5B).

4.2 AZIONE ANTIOSSIDANTE DEGLI ESTRATTI FENOLICI DI VINO

4.2.1 Misura della produzione della malonildialdeide (MDA)

Nelle cellule Caco-2 trattate con la miscela di ossisteroli è stata determinata come *marker* generico di danno ossidativo l'MDA, mediante TBARS e lettura all'HPLC.

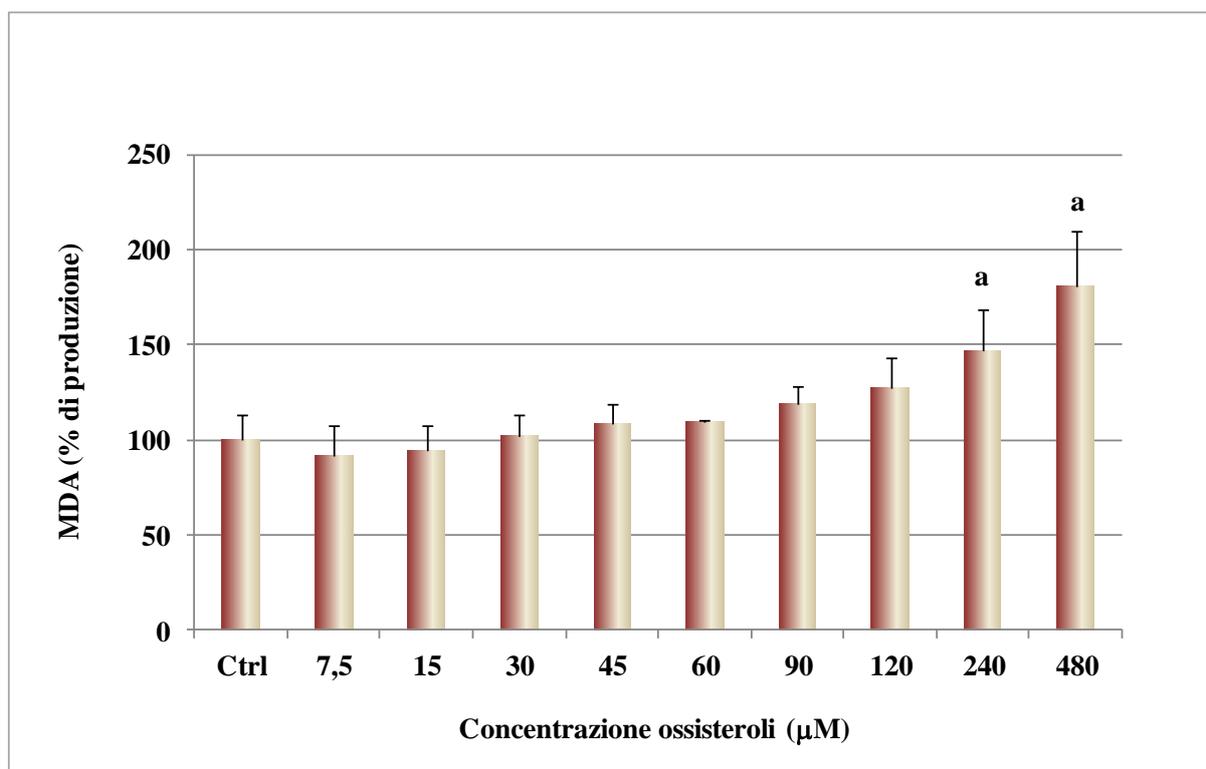


Figura 6 Percentuale di produzione di MDA rispetto al controllo nelle cellule Caco-2 incubate per 24 ore in presenza di diverse concentrazioni (7,5-480 µM) della miscela di ossisteroli. a= $p < 0,001$ verso il controllo (n=12)

In Figura 6 è rappresentata la quantità di MDA, espressa come percentuale di produzione rispetto al controllo, determinata nelle cellule trattate per 24 ore con diverse concentrazioni della miscela di ossisteroli (7,5-480 µM). In questa figura, si osserva un aumento della percentuale di produzione di MDA rispetto al controllo dalla concentrazione di 90 µM, che risulta significativo a partire dalla concentrazione di 240 µM.

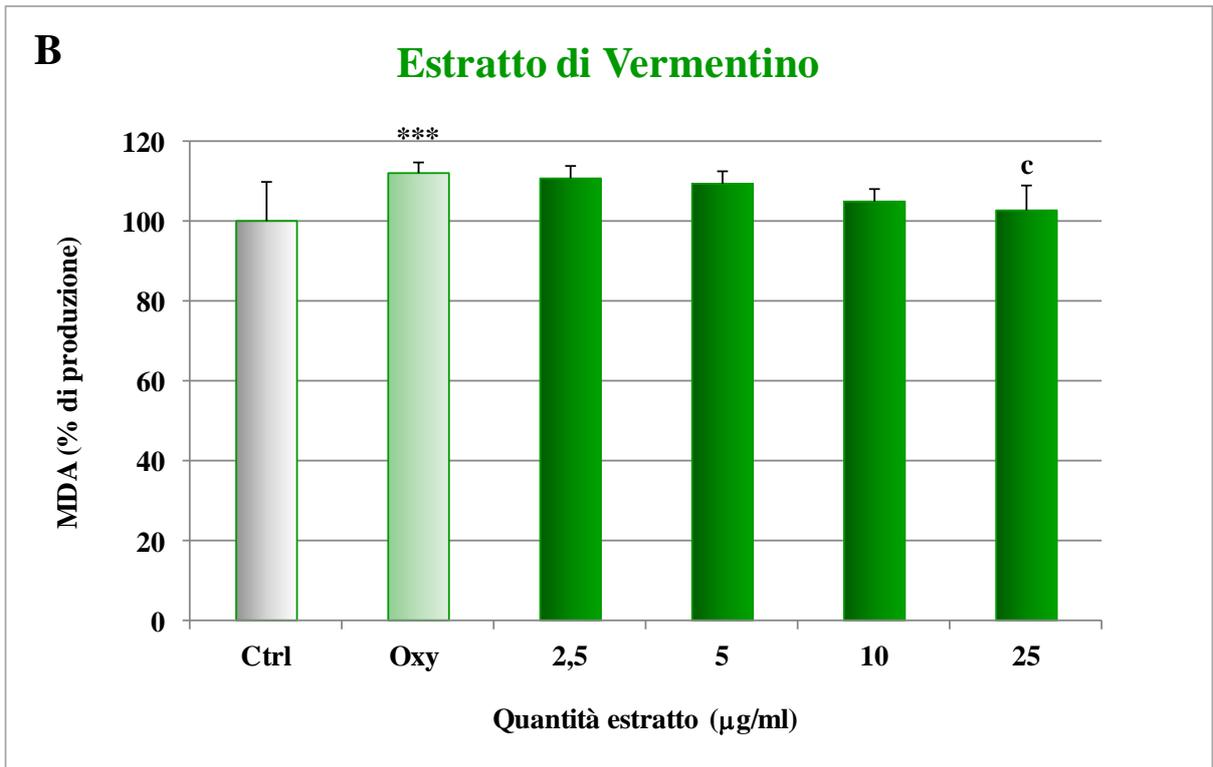
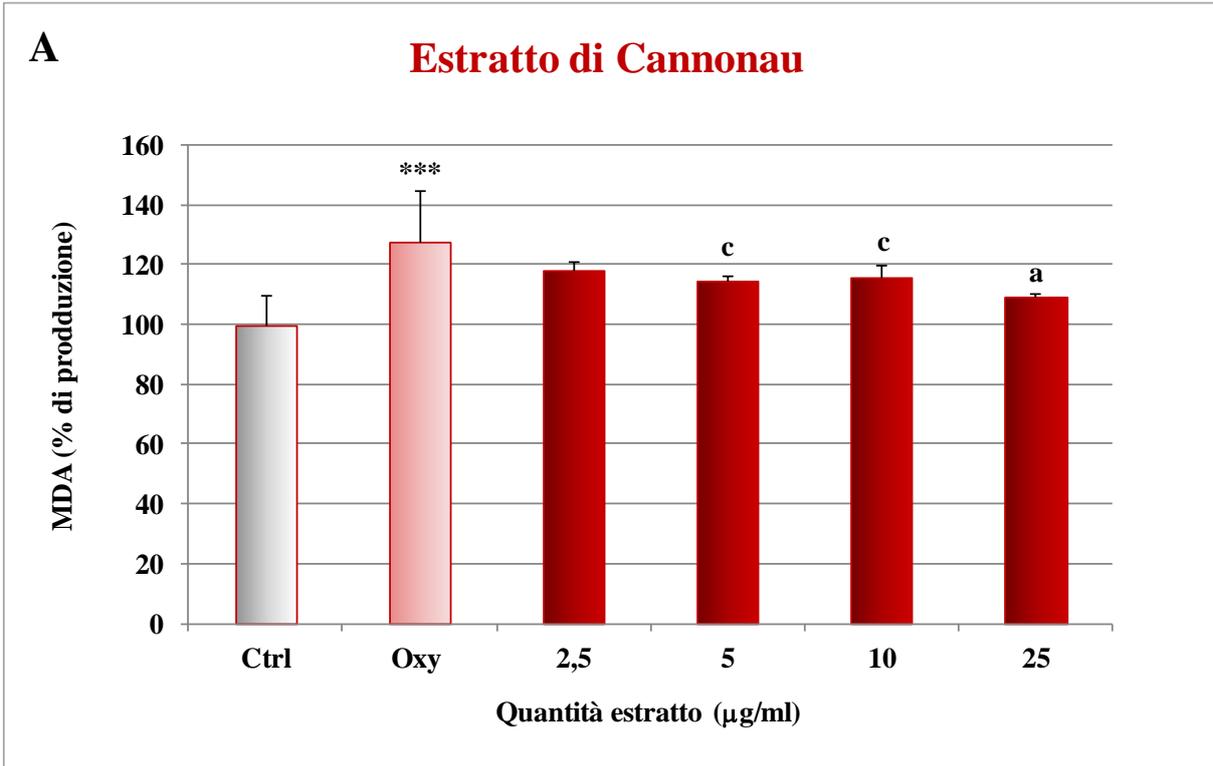


Figura 7 Percentuale di produzione di MDA rispetto al controllo nelle cellule Caco-2 pretrattate per 24 ore con diverse quantità (2,5-25 µg/ml) di estratto fenolico di vino Cannonau (A) o di vino Vermentino (B) e trattate per 24 ore con la miscela di ossisteroli (240 µM).
 ***= $p < 0,001$ verso il controllo; a= $p < 0,001$ e c= $p < 0,05$ verso l'ossidato (Oxy) (n=12)

Quando le cellule sono state pretrattate con quantità crescenti (2,5-25 $\mu\text{g/ml}$) di estratto fenolico per 24 ore e trattate con la miscela di ossisteroli (240 μM) per ulteriori 24 ore, la produzione di MDA indotta dalla miscela di ossisteroli, è stata significativamente ridotta. L'estratto fenolico di vino Cannonau ha mostrato un'attività significativa a partire dalla quantità di 5 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 7A), mentre quello di Vermentino solo alla quantità più alta testata (25 $\mu\text{g/ml}$) (Figura 7B).

4.2.2 Modulazione dell'attività della Glutazione perossidasi (GPx)

Nelle cellule Caco-2 è stato determinato anche l'effetto modulatore della miscela di ossisteroli sull'attività della GPx, un enzima antiossidante importante nella difesa dell'intestino dal danno ossidativo.

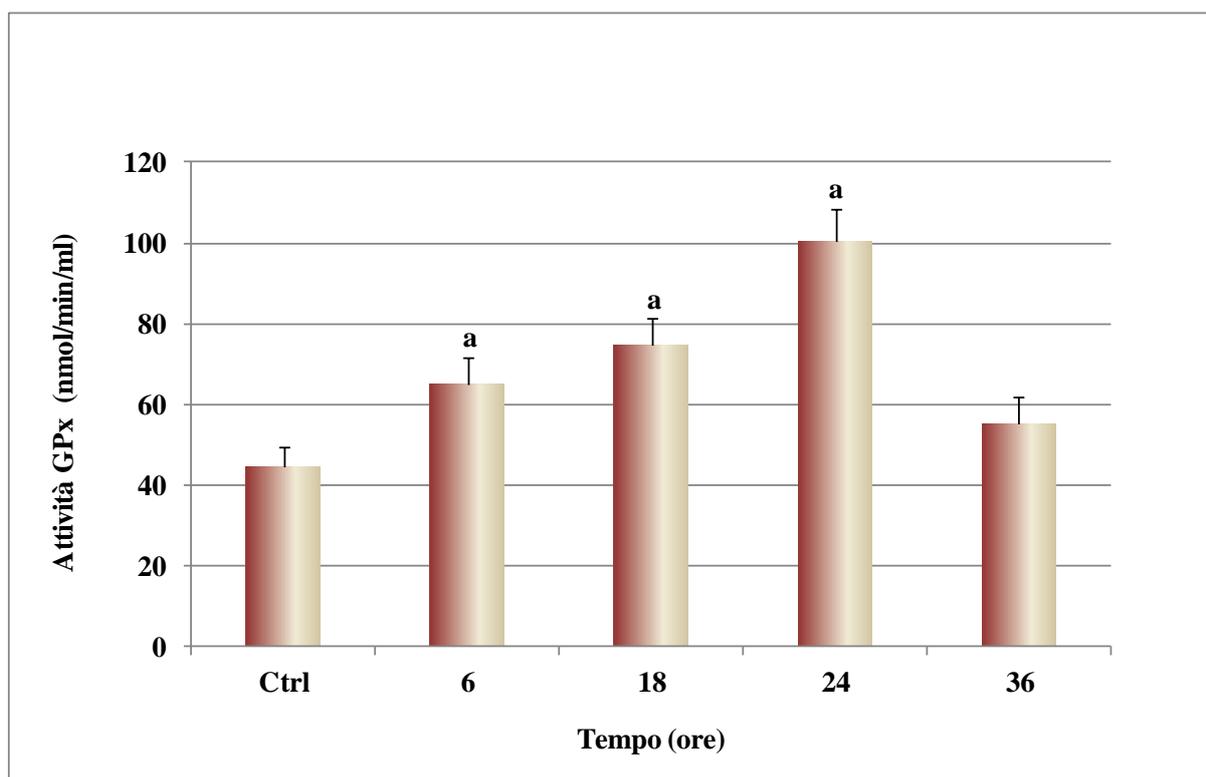


Figura 8 Attività della Glutazione perossidasi (GPx) (nmol/min/ml) nelle cellule Caco-2 incubate per diversi tempi (6-36 ore) in presenza della miscela di ossisteroli (240 µM).
a= $p < 0,001$ verso il controllo (n=9)

In Figura 8 viene mostrata la modulazione dell'attività della GPx, espressa come nmol/min/ml, in cellule Caco-2 incubate per diversi tempi (6-36 ore) con la miscela di ossisteroli (240 µM). La miscela ha indotto un significativo aumento dell'attività dell'enzima a 6, 18 e 24 ore, mentre dopo 36 ore di incubazione l'attività dell'enzima è risultata pressoché simile a quella del controllo.

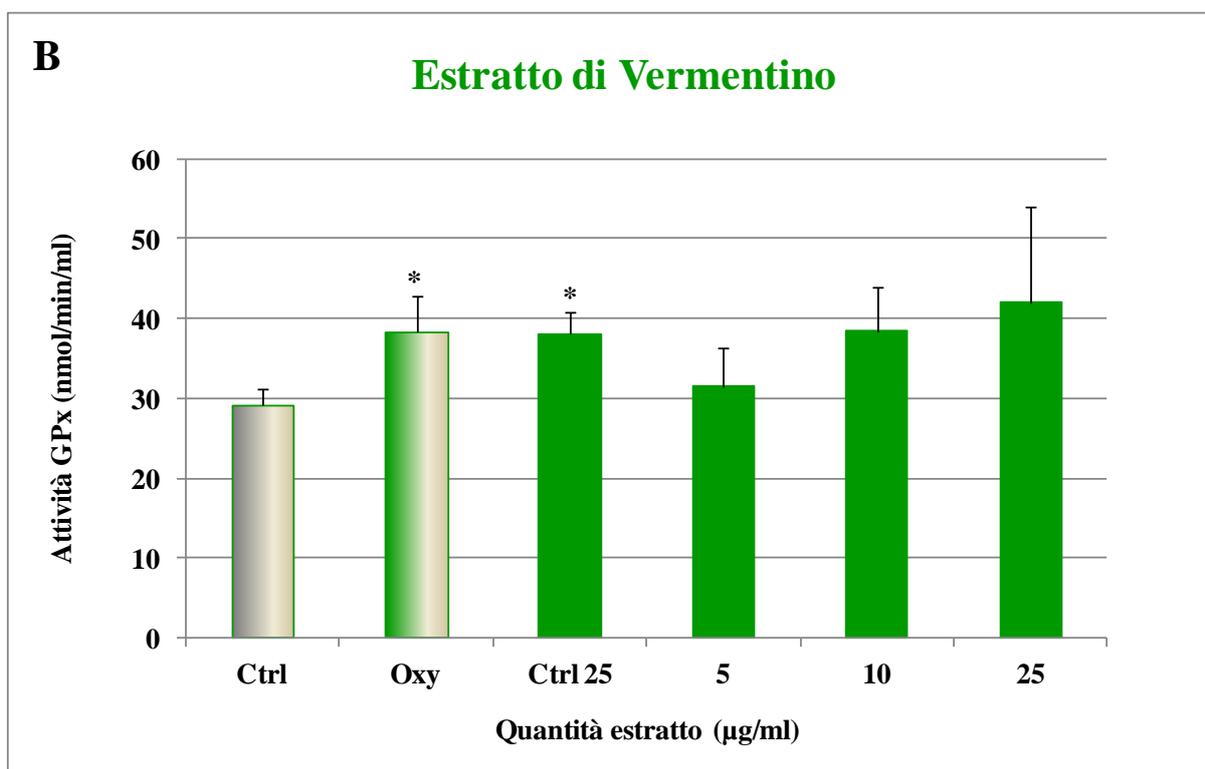
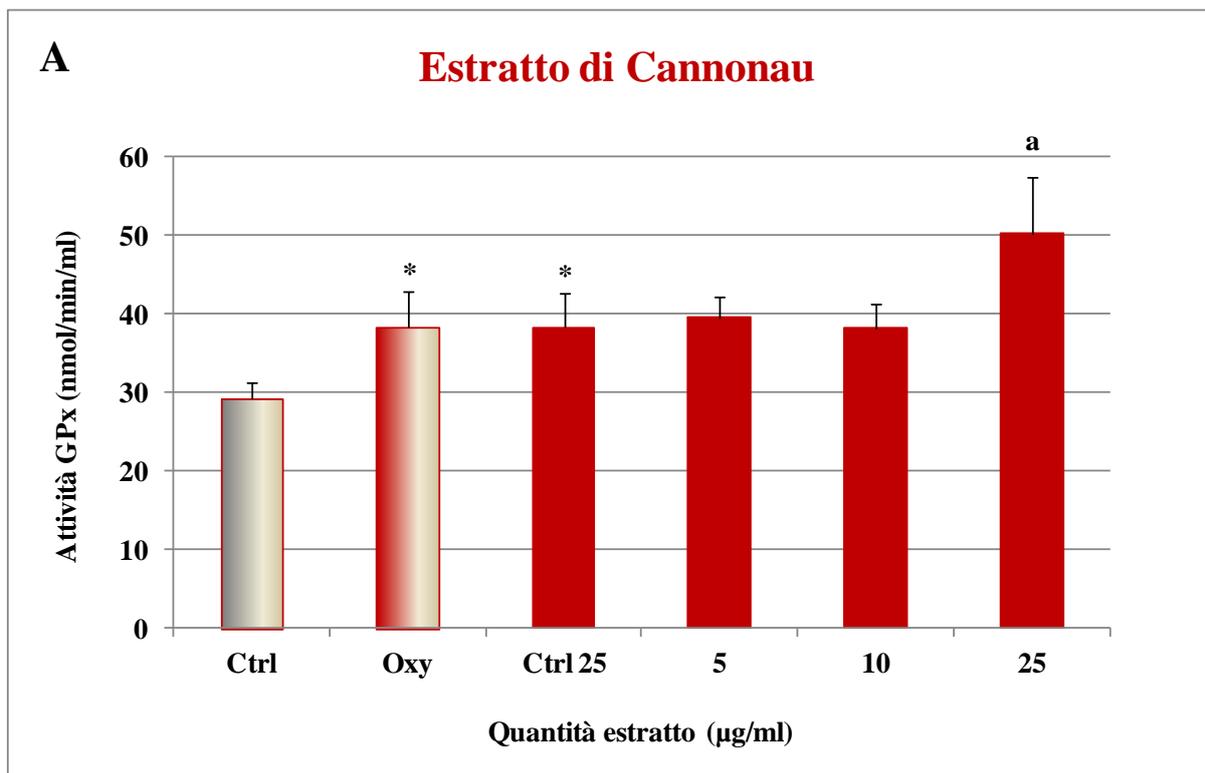


Figura 9 Attività della Glutazione perossidasi (GPx) (nmol/min/ml) nelle cellule Caco-2 pretrattate per 30 minuti con diverse quantità (5-25 µg/ml) di estratto fenolico di vino Cannonau (A) o di vino Vermentino (B) e trattate per 18 ore con la miscela di ossisteroli (240 µM).
 *=p<0,05 verso il controllo; a= p<0,001 verso l'ossidato (Oxy) (n=9)

Quando le Caco-2 sono state incubate in presenza dei soli estratti fenolici di vino Cannonau (Figura 9A) e Vermentino (Figura 9B) si è osservato un significativo aumento dell'attività enzimatica, paragonabile a quello osservato con la miscela di ossisteroli.

Nelle cellule trattate sia con gli estratti fenolici che con gli ossisteroli, l'incremento dell'attività della GPx rispetto a quanto rilevato nell'ossidato (Oxy) è risultato significativo solo con l'estratto di vino Cannonau alla quantità di 25 µg/ml (Figura 9A).

4.2.3 Determinazione della quantità di glutatione (GSH)

Come indicatore dello stato redox cellulare è stata determinata anche la quantità di glutatione ridotto (GSH).

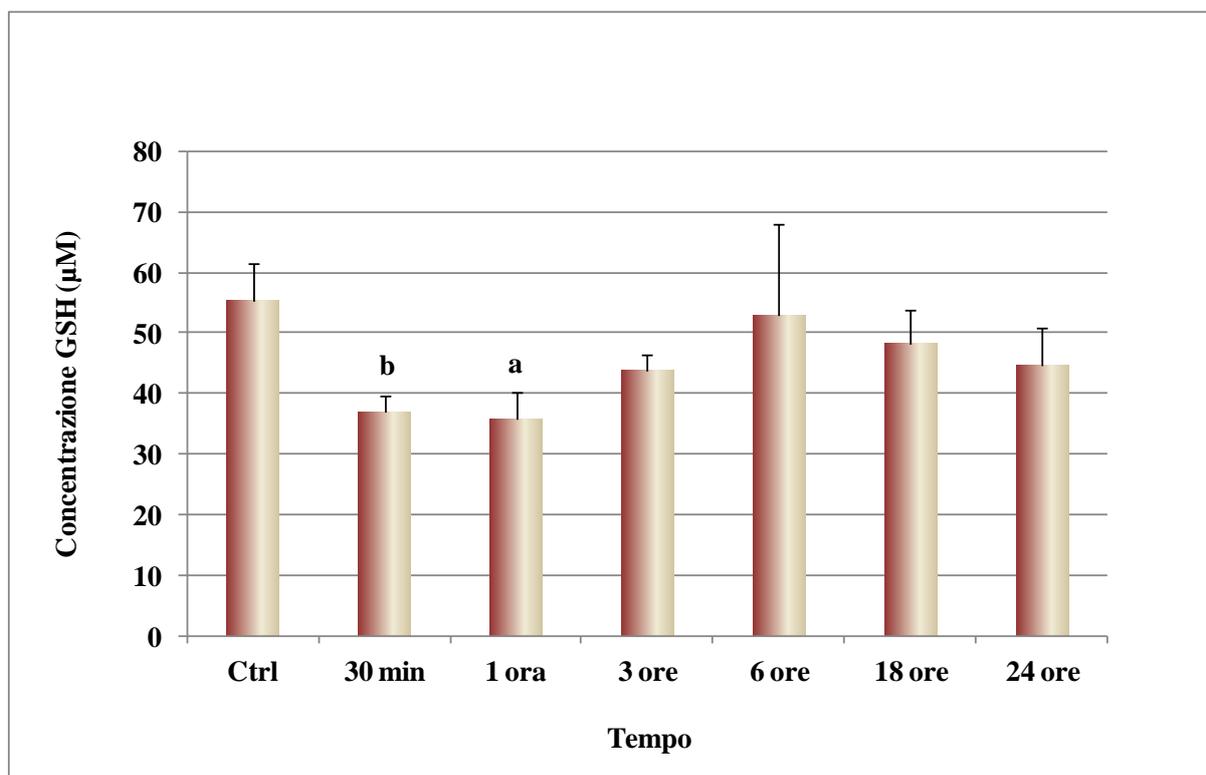


Figura 10 Concentrazione di glutatione (GSH) (μM) nelle cellule Caco-2 incubate per diversi tempi (30 min-24 ore) in presenza della miscela di ossisteroli ($180 \mu\text{M}$).
a= $p < 0,001$ e b= $p < 0,01$ verso il controllo (n=9).

Nella Figura 10 sono riportate le concentrazioni di GSH nelle cellule Caco-2 in seguito all'incubazione per diversi tempi (30 min-24 ore) con la miscela di ossisteroli ($180 \mu\text{M}$). La presenza della miscela ha comportato una significativa diminuzione della concentrazione di GSH dopo 30 minuti di incubazione. La concentrazione è aumentata dopo 3 ore fino a tornare a valori simili a quelli del controllo dopo 6 ore.

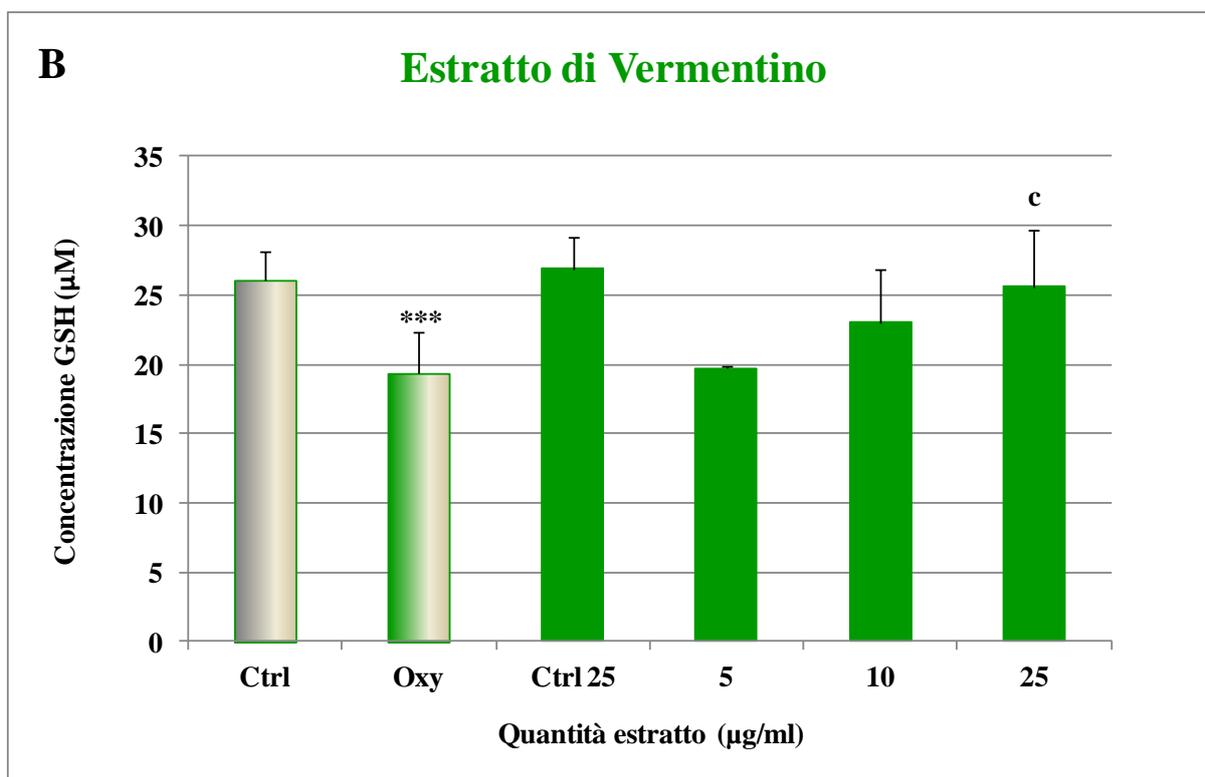
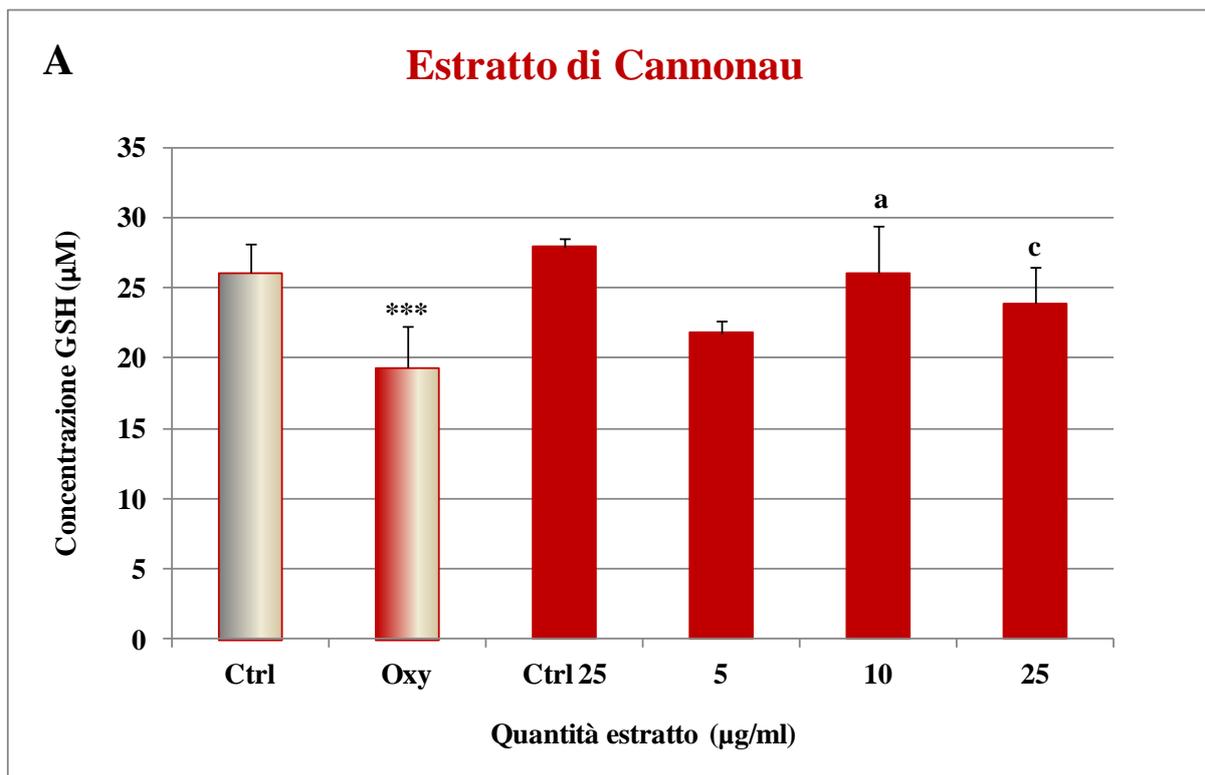


Figura 11 Concentrazione di glutatione (GSH) (μM) nelle cellule Caco-2 pretrattate per 30 minuti con diverse quantità (5-25 $\mu\text{g/ml}$) di estratto fenolico di vino Cannonau (A) o di vino Vermentino (B) e trattate per 30 minuti con la miscela di ossisteroli (180 μM).

***= $p < 0,001$ verso il controllo; a= $p < 0,001$ e c= $p < 0,05$ verso l'ossidato (Oxy) (n=9)

La diminuzione di GSH indotta dalla miscela di ossisteroli è stata significativamente contrastata dall'estratto di Cannonau (Figura 11A) a partire dalla quantità di 10 µg/ml, e da quello di Vermentino (Figura 11B) alla quantità più alta testata (25 µg/ml), come si può osservare dalla Figura 11, dove sono riportati i dati relativi alle cellule pretrattate con quantità crescenti (5-25 µg/ml) di estratto fenolico e trattate per 30 minuti con la miscela di ossisteroli (180 µM).

4.2.4 Produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS)

La generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) in cellule Caco-2 pretrattate con gli estratti fenolici (25 $\mu\text{g/ml}$) per 1 ora, trattate con la miscela di ossisteroli (60 μM) per 30 minuti e, successivamente esposte alla forma ridotta della diclorofluoresceina diacetato (DCFH-DA 10 μM) per 30 minuti è stata visualizzata, come DCF ossidata fluorescente, mediante l'utilizzo di un microscopio confocale.

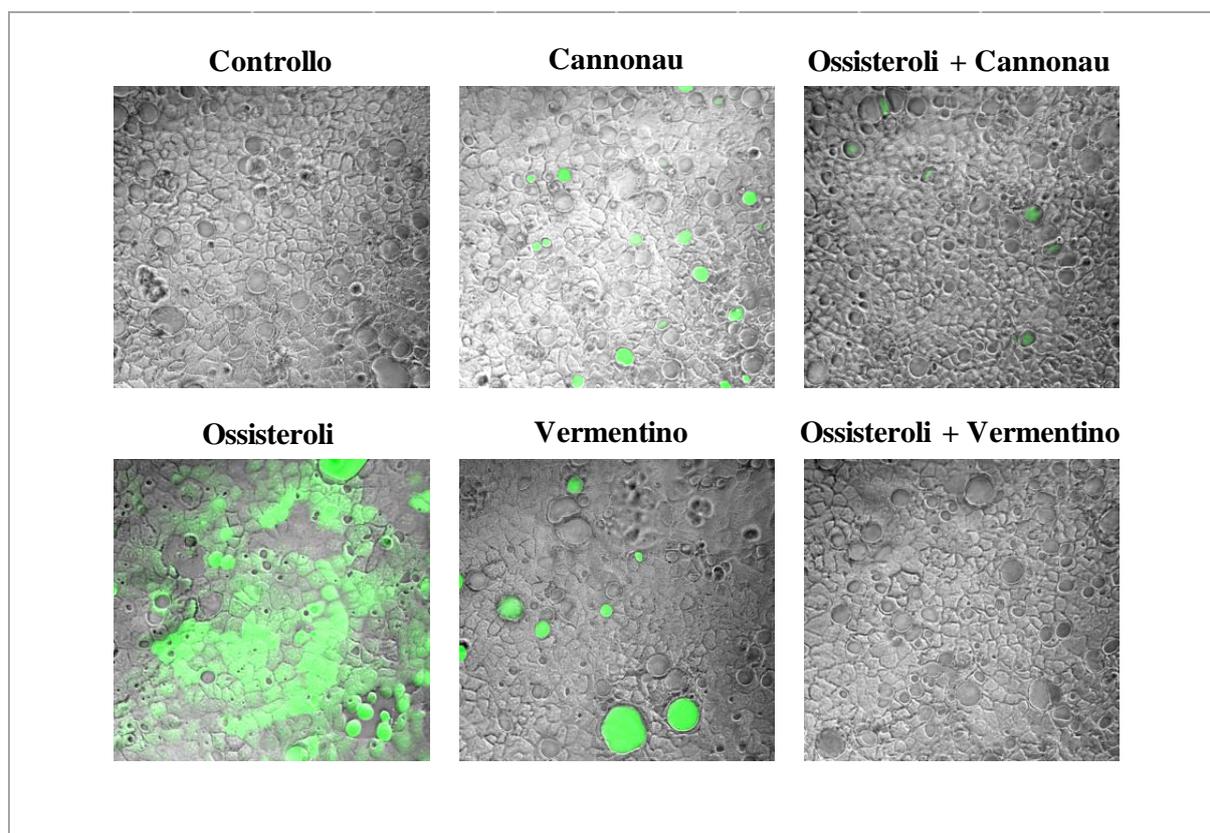


Figura 12 Inibizione della generazione di ROS nelle cellule Caco-2 pretrattate per 1 ora con estratti fenolici di vino Cannonau o Vermentino (25 $\mu\text{g/ml}$), trattate per 30 minuti con la miscela di ossisteroli (60 μM) e incubate con DCFH-DA (10 μM) per 30 minuti.

Entrambi gli estratti fenolici sono stati in grado di inibire la produzione di ROS indotta dagli ossisteroli (Figura 12).

4.2.5 Modulazione dell'attività della NADPH ossidasi 1 (NOX1)

Nelle cellule Caco-2 pretrattate con gli estratti fenolici di vino Cannonau e Vermentino (25 µg/ml) per 1 ora e, successivamente, trattate con la miscela di ossisteroli (60 µM) per 30 minuti è stata valutata anche la modulazione dell'attività della NADPH ossidasi 1 (NOX1). L'attività della NOX1 è stata valutata mediante *Western blotting*.

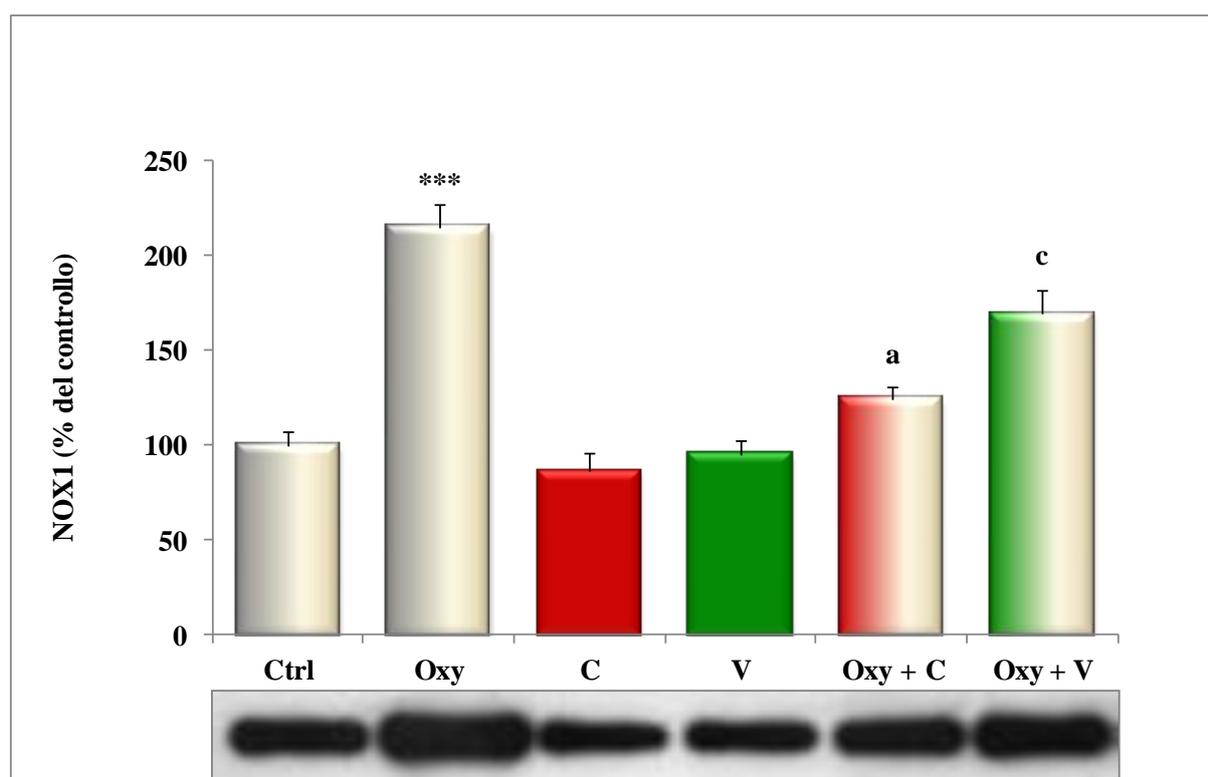


Figura 13 Attività della NOX1 nelle cellule Caco-2 pretrattate per 1 ora con estratto fenolico di vino Cannonau o di vino Vermentino (25 µg/ml) e trattate per 30 minuti con la miscela di ossisteroli (60 µM).

***= $p < 0,001$ verso il controllo; a= $p < 0,001$ e c= $p < 0,05$ verso l'ossidato (Oxy) (n=3)

Come si può osservare dalla Figura 13, la miscela di ossisteroli è in grado di indurre un significativo incremento dell'attività della NOX1, espressa come percentuale rispetto al controllo, che viene significativamente ridotta da entrambi gli estratti fenolici di vino, anche se l'estratto di vino Cannonau ha mostrato un'efficacia maggiore.

4.3 AZIONE ANTI-INFIAMMATORIA DEGLI ESTRATTI FENOLICI DI VINO

4.3.1 *Induzione della sintesi di interleuchina 6 (IL-6) e interleuchina 8 (IL-8)*

Nelle cellule Caco-2 incubate per 24 ore con la miscela di ossisteroli (30 o 60 μM) è stata valutata la capacità della miscela di indurre la sintesi di due citochine pro-infiammatorie, l'interleuchina 6 (IL-6) e l'interleuchina 8 (IL-8). La concentrazione delle citochine, espressa come pg/mg proteine rilasciate, è stata valutata mediante l'utilizzo del metodo ELISA nel mezzo di coltura.

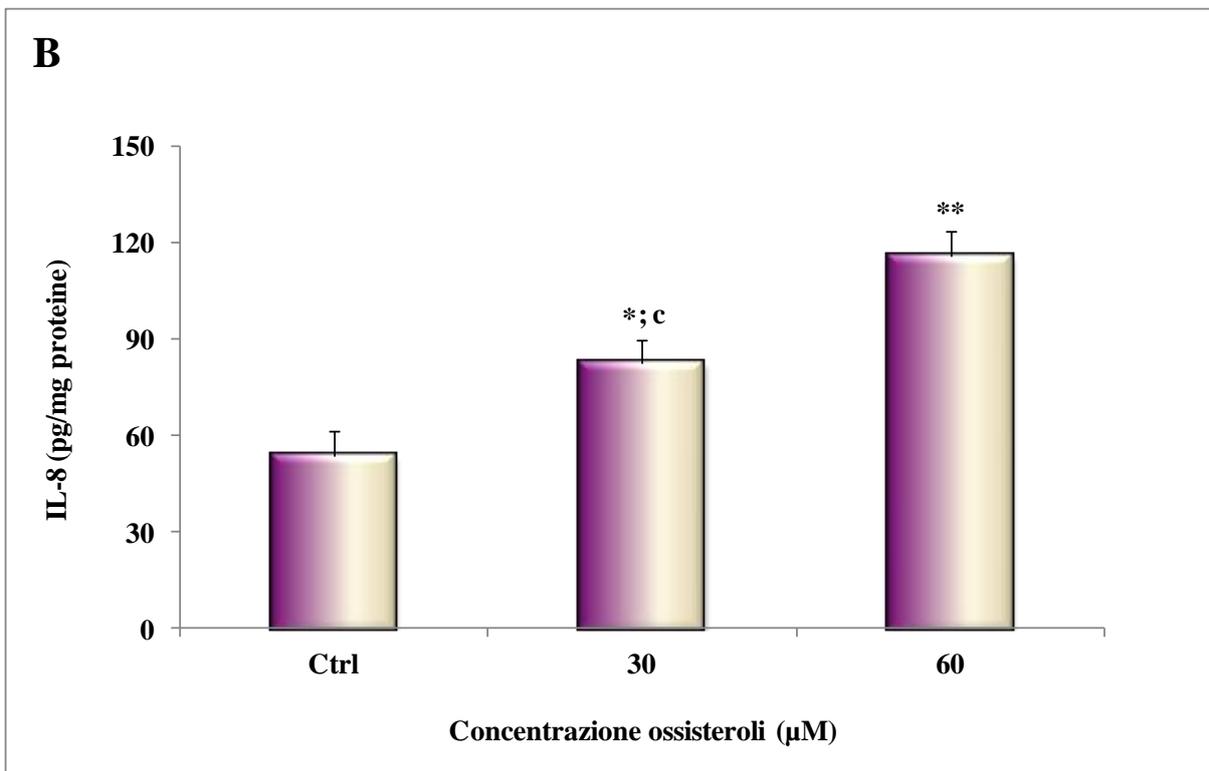
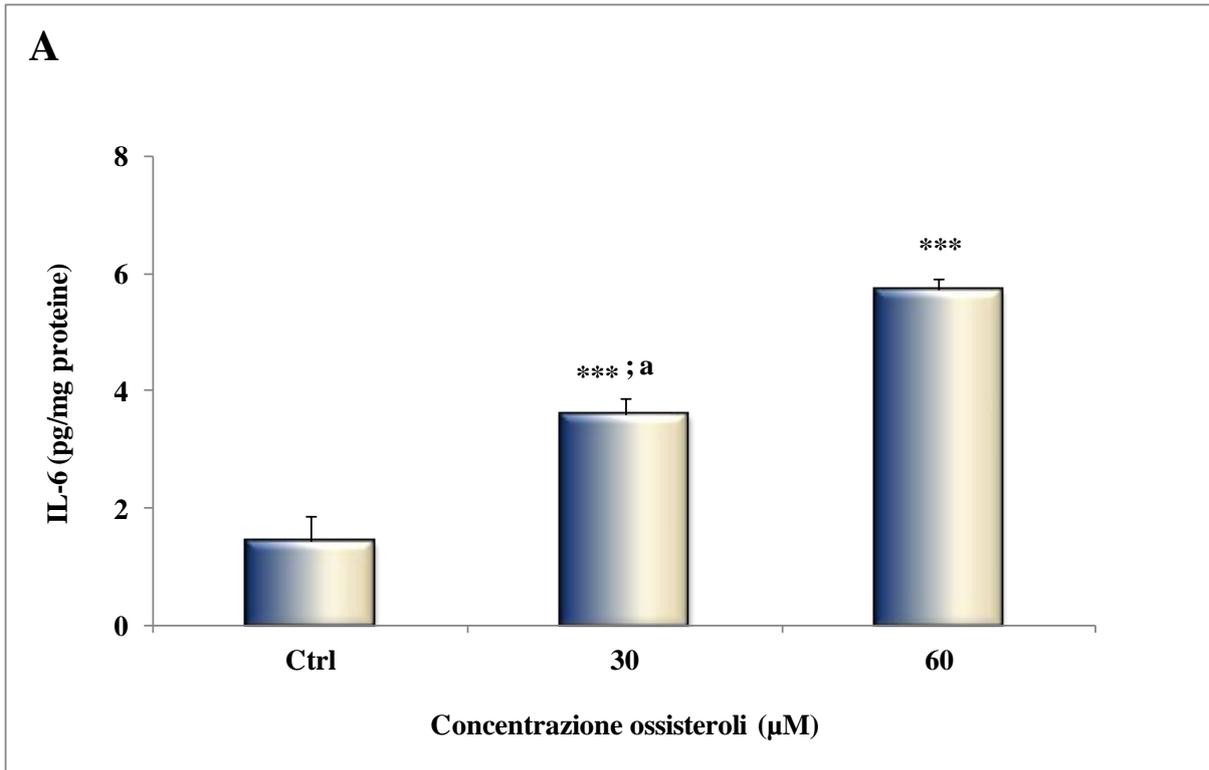


Figura 14 Sintesi di IL-6 (A) e IL-8 (B) (pg/mg proteine) nelle cellule Caco-2 incubate per 24 ore in presenza della miscela di ossisteroli (30 o 60 μM).
 ***= $p < 0,001$, **= $p < 0,01$ e *= $p < 0,05$ verso il controllo; a= $p < 0,001$ e c= $p < 0,05$ verso l'ossidato 60 μM (n=9).

Come riportato in Figura 14, la miscela di ossisteroli ha significativamente indotto la sintesi delle interleuchine 6 (Figura 14A) e 8 (Figura 14B) a entrambe le concentrazioni testate, in modo dose-dipendente.

Per valutare se la NADPH ossidasi colonica (NOX1) fosse coinvolta nella sintesi di IL-6 e IL-8 indotta dalla miscela di ossisteroli, le cellule Caco-2 sono state incubate con il DPI (5 μM), un inibitore della NADPH ossidasi, per 30 minuti e, successivamente, trattate per 24 ore con la miscela di ossisteroli (60 μM).

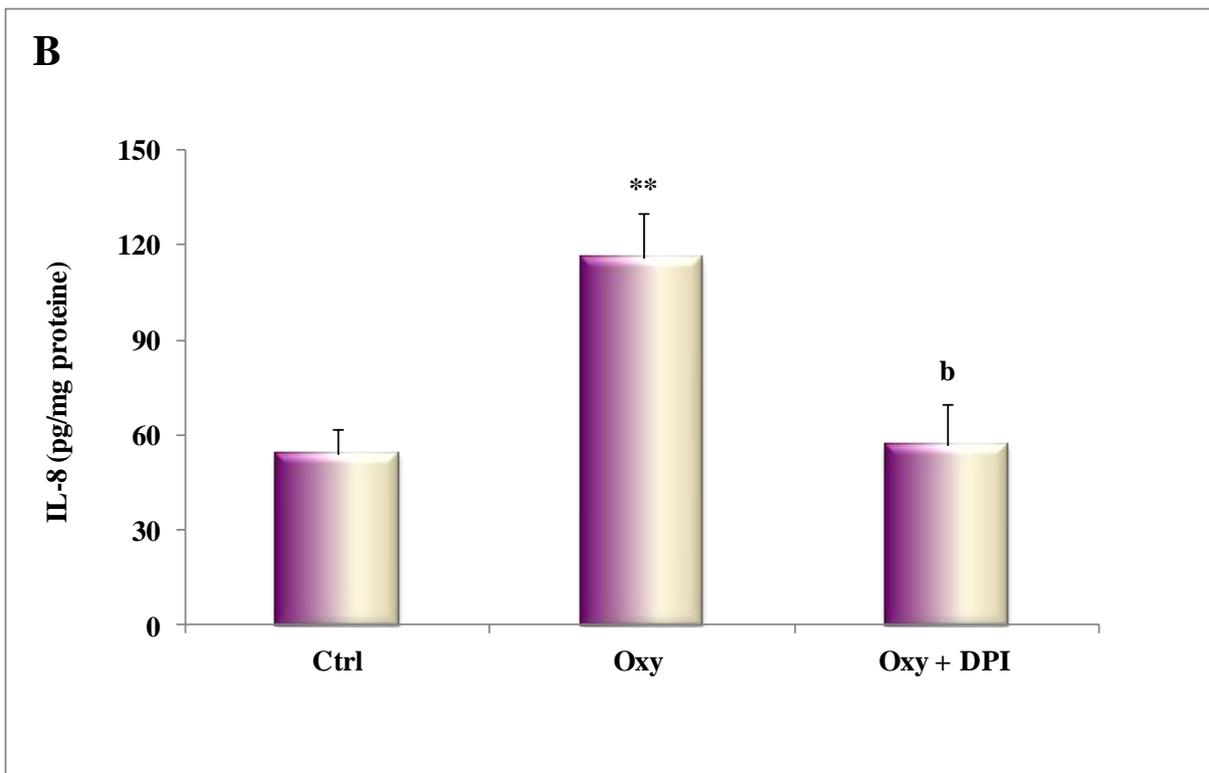
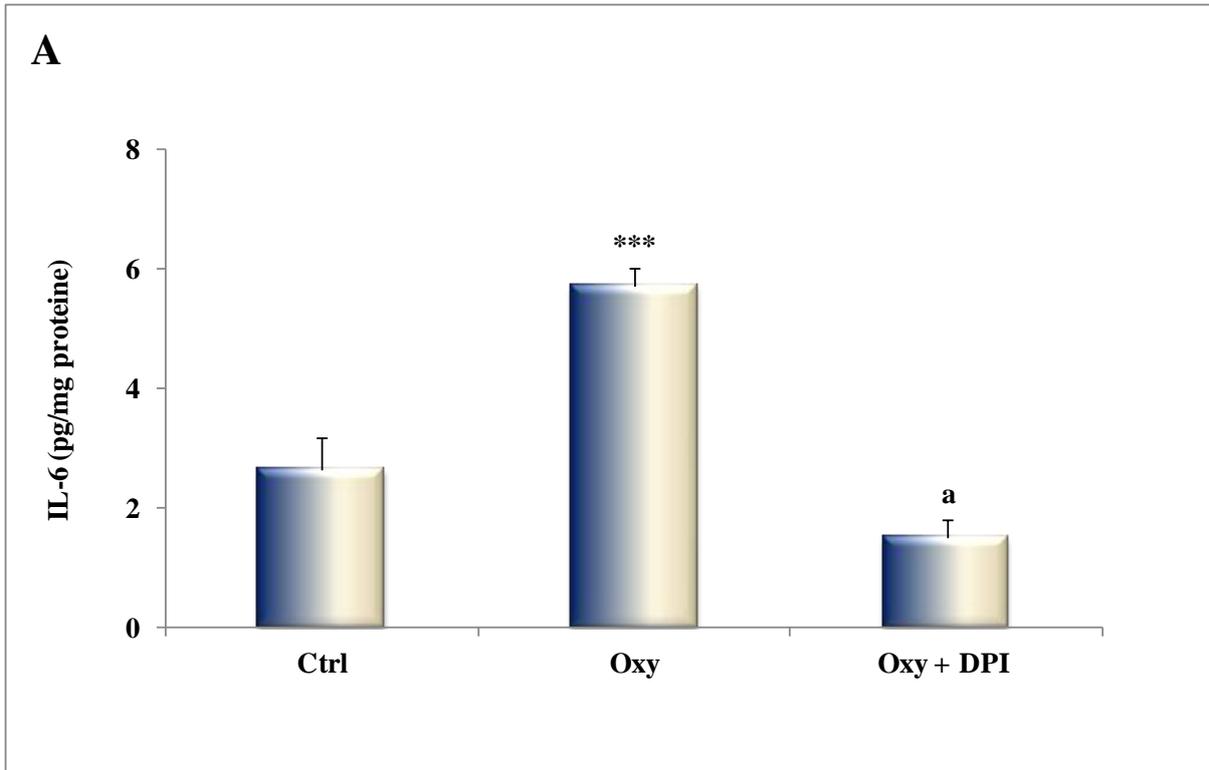


Figura 15 Sintesi di IL-6 (A) e IL-8 (B) (pg/mg proteine) nelle cellule Caco-2 incubate per 30 minuti in presenza di DPI (5 μ M) e trattate per 24 ore con la miscela di ossisteroli (60 μ M).
 ***= $p < 0,001$ e **= $p < 0,01$ verso il controllo; a= $p < 0,001$ e b= $p < 0,01$ verso l'ossidato (Oxy) (n=9).

Come si può osservare nella Figura 15 A e B, il DPI ha inibito significativamente la stimolazione da parte degli ossisteroli della sintesi di entrambe le interleuchine.

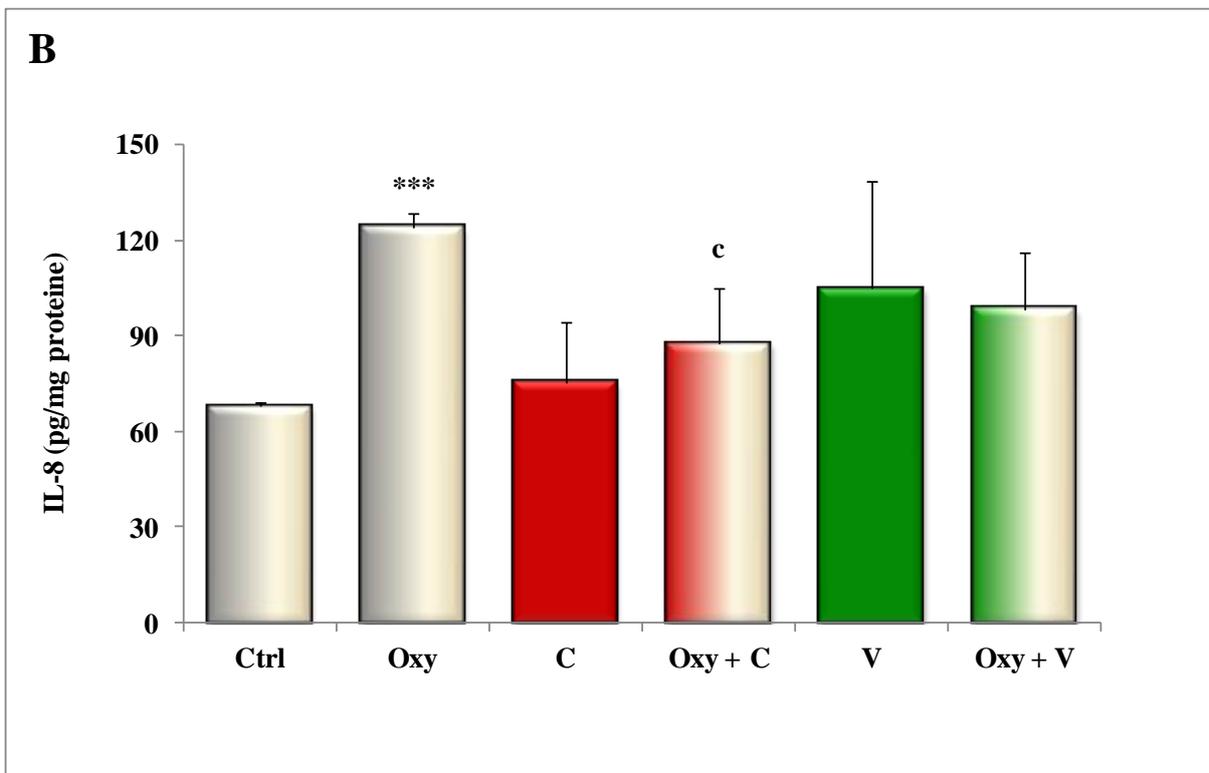
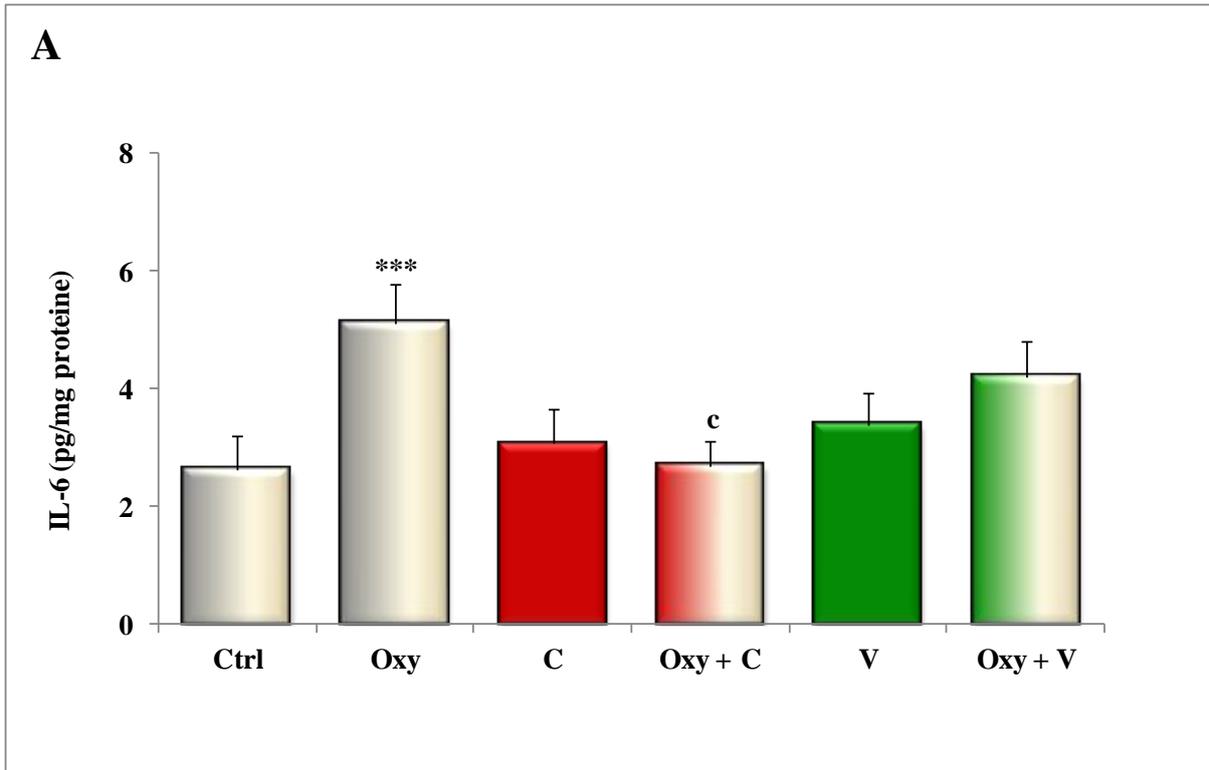


Figura 16 Sintesi di IL-6 (A) e IL-8 (B) (pg/mg proteine) nelle cellule Caco-2 pretrattate per 1 ora con estratto fenolico di vino Cannonau o di vino Vermentino (25 µg/ml) e trattate per 24 ore con la miscela di ossisteroli (60 µM).

***=p<0,001 verso il controllo; c=p<0,05 verso l'ossidato (Oxy) (n=9)

Nella figura 16 A e B è riportata la quantità di IL-6 e IL-8 misurata nelle Caco-2 pretrattate per 1 ora con gli estratti fenolici di vino Cannonau e Vermentino (25µg/ml) e trattate per 24 ore con la miscela di ossisteroli (60 µM).

Come si può osservare in Figura 16 A e B, l'aumento della sintesi delle interleuchine 6 e 8 indotto dalla miscela di ossisteroli è stato significativamente prevenuto dall'estratto fenolico di vino Cannonau, ma non da quello di Vermentino.

4.4 AZIONE MODULATORIA DEGLI ESTRATTI FENOLICI DI VINO

4.4.1 Modulazione delle MAPKs

Per valutare mediante *Western blotting* la modulazione dei segnali intracellulari, ERK, p38 e JNK, le cellule Caco-2 sono state incubate con la miscela di ossisteroli (60 μ M) per diversi tempi (da 30 minuti a 4 ore). I valori dell'intensità delle bande, normalizzati utilizzando i corrispondenti valori delle proteine totali ed espressi come percentuale rispetto al controllo, sono riportati in Figura 17 (ERK), in Figura 18 (p38) e in Figura 19 (JNK).

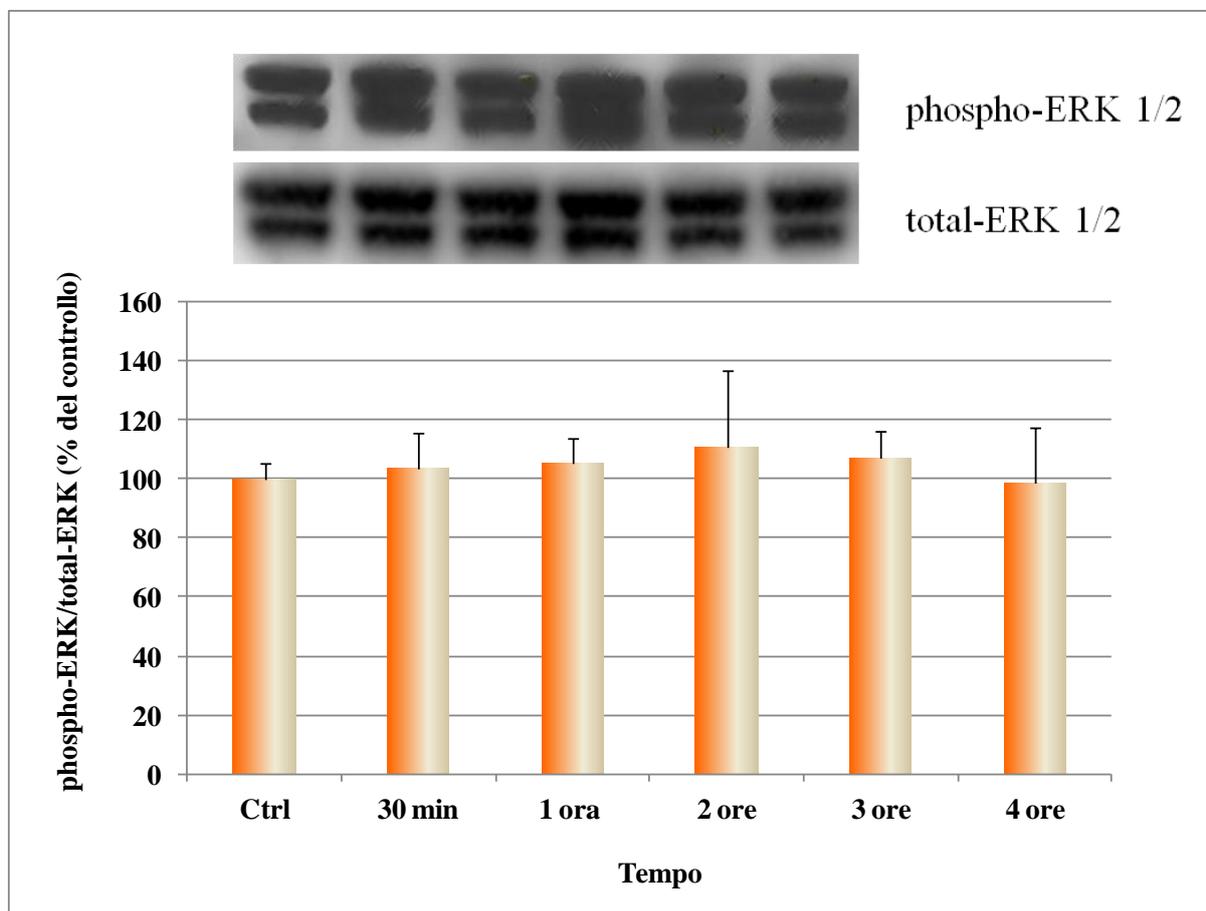


Figura 17 Percentuale di ERK1/2 fosforilata rispetto al controllo nelle cellule Caco-2 incubate per diversi tempi (30 min-4 ore) in presenza della miscela di ossisteroli (60 μ M) (n=6).

La miscela non determina nessun cambiamento nella fosforilazione di ERK1/2 alla concentrazione e ai tempi testati (Figura 17), rispetto al controllo.

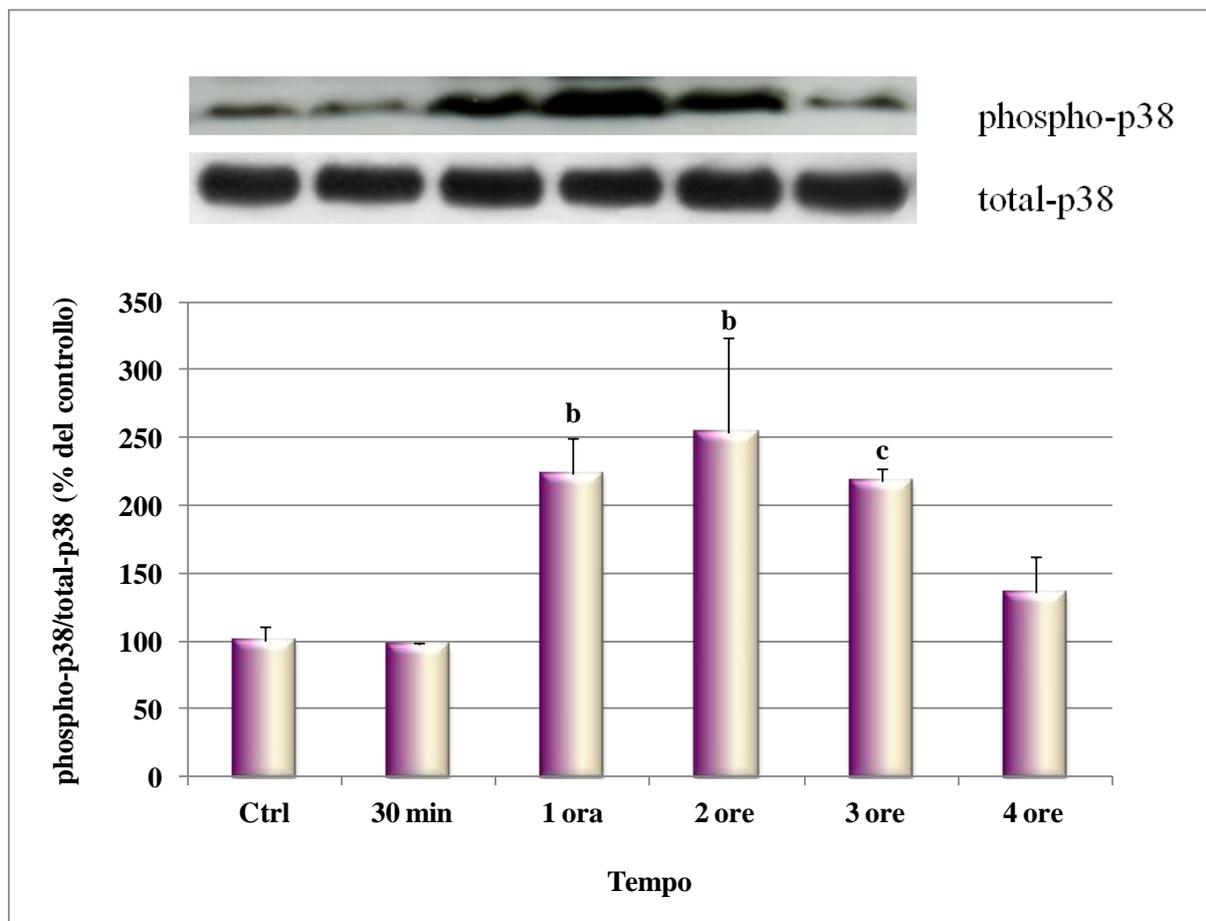


Figura 18 Percentuale di p38 fosforilata rispetto al controllo nelle cellule Caco-2 incubate per diversi tempi (30 min-4 ore) in presenza della miscela di ossisteroli (60 μ M). b= $p < 0,01$ e c= $p < 0,05$ verso il controllo (n=6).

In Figura 18 si può osservare come la miscela di ossisteroli 60 μ M sia risultata in grado di indurre significativamente, dopo 1 ora di incubazione, la fosforilazione di p38, che è aumentata ulteriormente dopo 2 ore. Alle 3 ore si osserva nuovamente una diminuzione della proteina p38 fosforilata che diminuisce ulteriormente dopo 4 ore di incubazione.

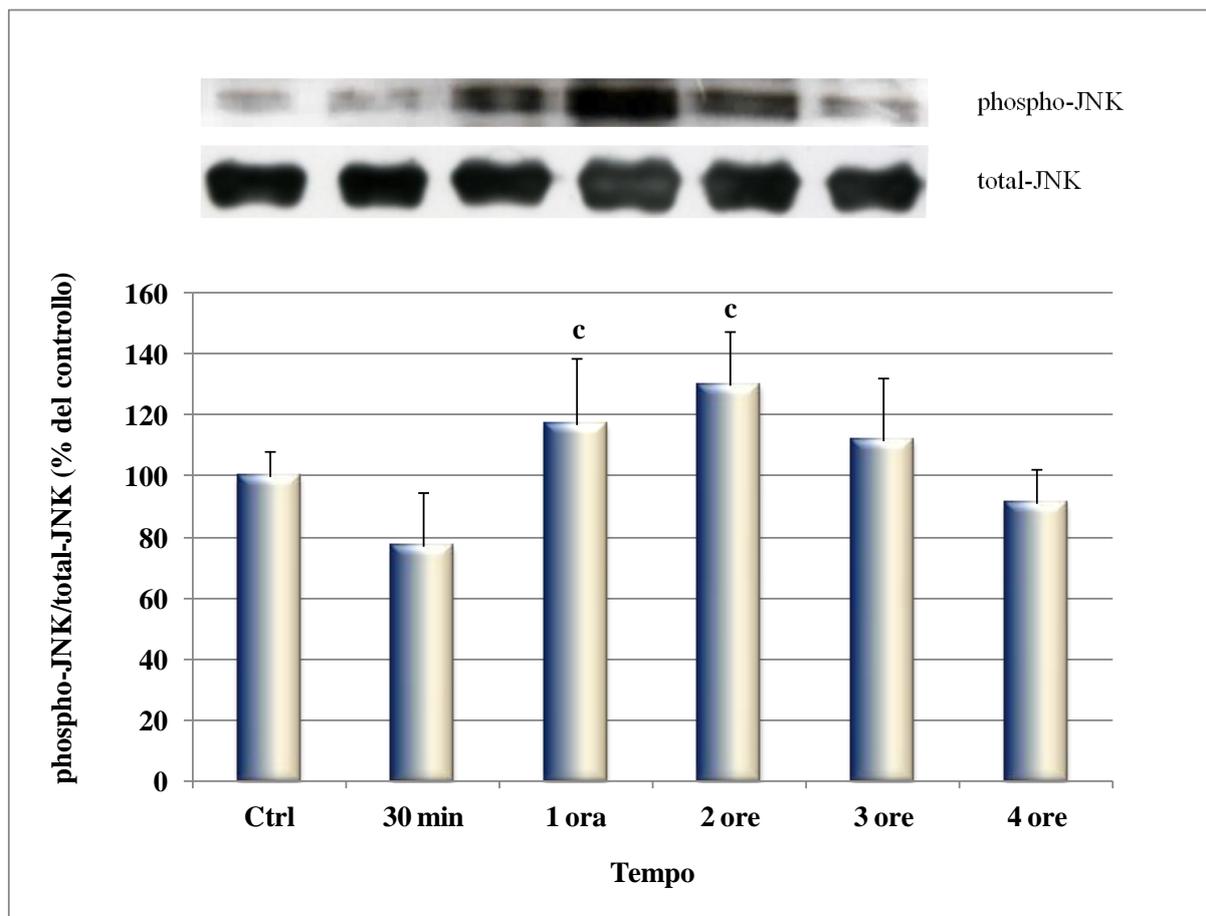


Figura 19 Percentuale di JNK fosforilata rispetto al controllo nelle cellule Caco-2 incubate per diversi tempi (30 min-4 ore) in presenza della miscela di ossisteroli (60 μ M).
c= $p < 0,05$ verso il controllo (n=6).

La miscela di ossisteroli ha indotto, inoltre, dopo 1 ora un significativo incremento della fosforilazione di JNK che è aumentata ulteriormente dopo 2 ore di incubazione; la fosforilazione di JNK quindi diminuisce, tornando ai valori del controllo dopo 3 e 4 ore, come mostrato in Figura 19.

In una successiva serie di esperimenti le cellule sono state pretrattate per 1 ora con gli estratti fenolici di vino Cannonau e Vermentino (25µg/ml) e trattate con la miscela (60µM) per 2 ore. Poiché ERK non è stata modulata dalla miscela di ossisteroli, l'effetto esplicato dagli estratti di vino è stato valutato solo per i segnali intracellulari p38 (Figura 20) e JNK (Figura 21).

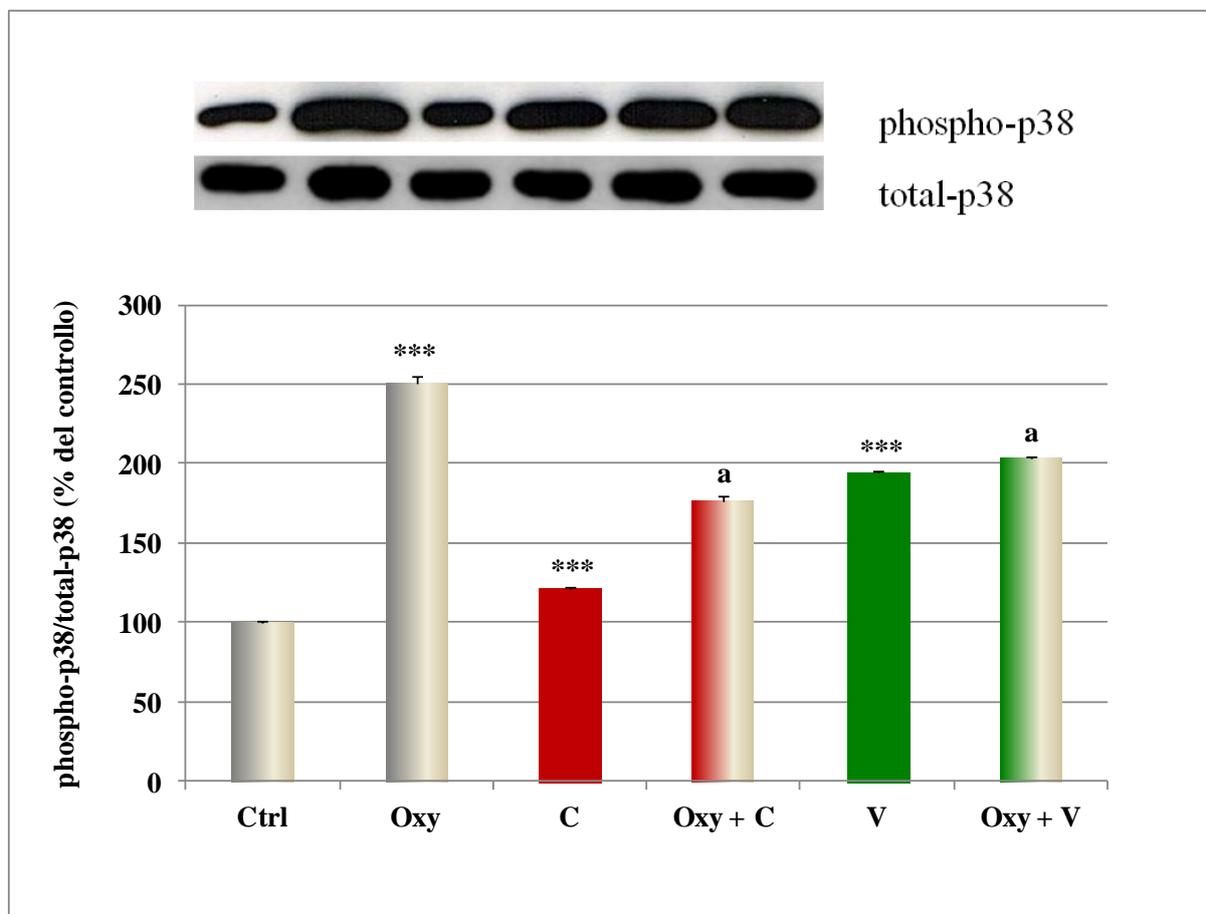


Figura 20 Percentuale di p38 fosforilata rispetto al controllo nelle cellule Caco-2 pretrattate per 1 ora con estratto fenolico di vino Cannonau o di vino Vermentino (25 µg/ml) e trattate per 2 ore con la miscela di ossisteroli (60 µM).

***=p<0,001 verso il controllo; a= p<0,001 verso l'ossidato (Oxy) (n=6)

Come mostrato in Figura 20, nei campioni incubati solo con l'estratto di Cannonau o di Vermentino si osserva un aumento significativo della proteina p38 fosforilata. Nonostante questo, l'induzione della fosforilazione di p38 da parte della miscela è stato contrastato in maniera significativa dal pretrattamento delle cellule sia con l'estratto fenolico di vino Cannonau che con quello di Vermentino.

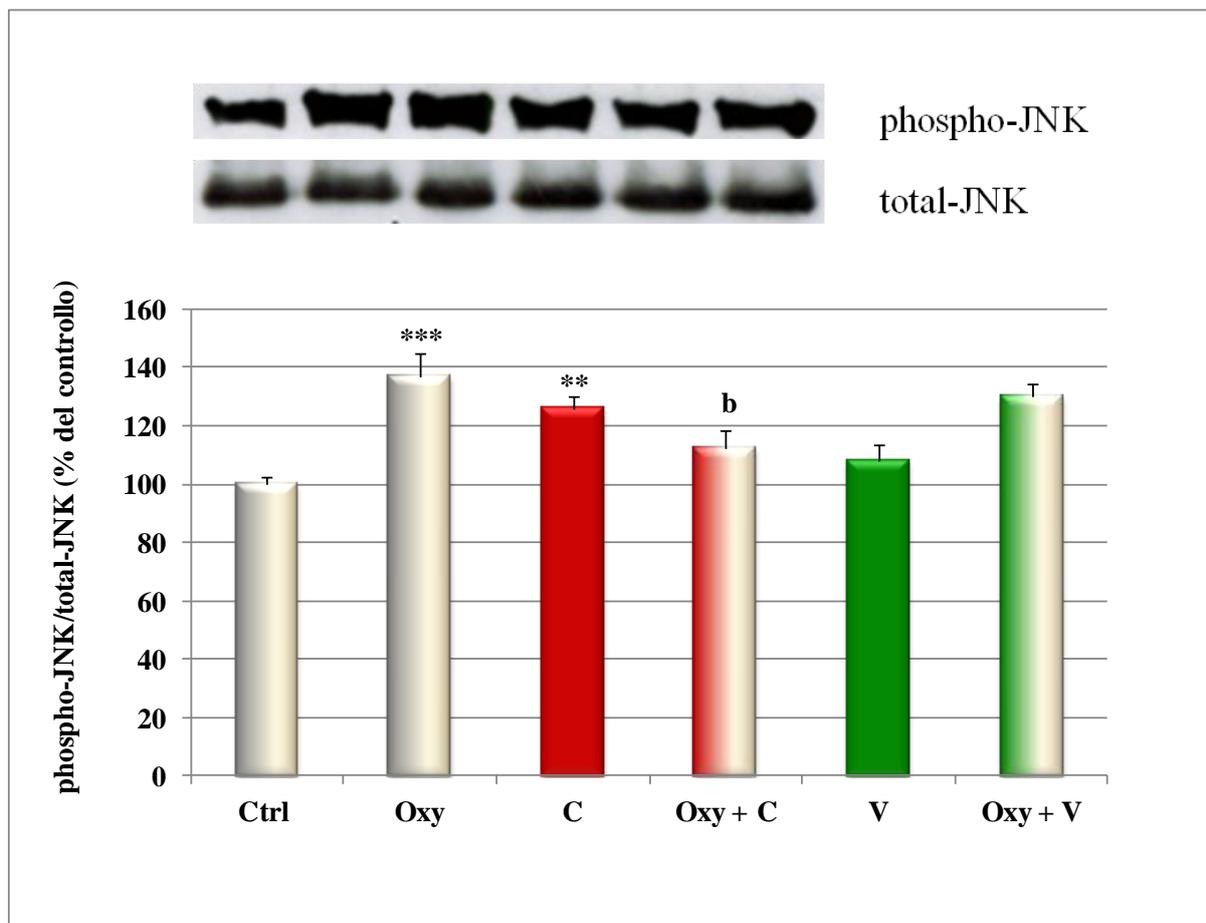


Figura 21 Percentuale di JNK fosforilata rispetto al controllo nelle cellule Caco-2 pretrattate per 1 ora con estratto fenolico di vino Cannonau o di vino Vermentino (25 µg/ml) e trattate per 2 ore con la miscela di ossisteroli (60 µM).

***= $p < 0,001$ e **= $p < 0,01$ verso il controllo; b= $p < 0,01$ verso l'ossidato (Oxy) (n=6).

In Figura 21 si osserva che l'estratto fenolico di vino Cannonau ha indotto una significativa fosforilazione di JNK ed è risultato in grado di indurre una significativa inibizione della fosforilazione della proteina JNK indotta dagli ossisteroli.

5 DISCUSSIONE

I prodotti di ossidazione del colesterolo, gli ossisteroli, possono essere generati endogenamente, attraverso reazioni enzimatiche e non enzimatiche, o possono derivare dalla dieta. Gli alimenti contenenti colesterolo, infatti, sono suscettibili all'ossidazione; reazioni ossidative si verificano durante la lavorazione, principalmente in seguito a trattamento termico, e durante la conservazione a lungo termine (**Biasi F. et al., 2013a**).

Nell'organismo, gli ossisteroli svolgono importanti funzioni fisiologiche ma mostrano anche diversi effetti dannosi come citotossicità, induzione della morte cellulare per necrosi o apoptosi ed effetti pro-cancerogeni, pro-ossidanti e pro-infiammatori (**Vejux A. and Lizard G., 2009**).

L'accumulo patologico degli ossisteroli può contribuire alla insorgenza e alla progressione delle principali malattie croniche in cui l'infiammazione, ma anche il danno ossidativo e in una certa misura la morte cellulare, svolgono un ruolo centrale. Infatti, alcuni ossisteroli esercitano forti effetti pro-ossidanti e pro-infiammatori a concentrazioni rilevabili nelle lesioni tipiche dell'aterosclerosi, nelle patologie neurodegenerative, nella degenerazione maculare correlata all'età e in altre condizioni patologiche caratterizzate da un alterato *uptake* e/o metabolismo del colesterolo (**Poli G. et al., 2013**). Recenti studi hanno dimostrato anche il coinvolgimento degli ossisteroli nella patogenesi delle malattie infiammatorie croniche intestinali e nello sviluppo di diverse forme tumorali che interessano il tratto gastrointestinale (**Biasi F. et al., 2013a**).

L'intestino infatti è il primo sito esposto all'azione dei prodotti dell'ossidazione dei lipidi alimentari, idroperossidi e ossisteroli, che esercitano un forte effetto citotossico sugli enterociti, alterandone lo stato redox fino a scatenare una reazione infiammatoria e/o ad indurre un danno ossidativo (**Rezaie A. et al., 2007**).

Evidenze sperimentali suggeriscono che l'ingestione di composti ad azione antiossidante, come i composti fenolici, sia in grado di contrastare lo stress ossidativo e la reazione infiammatoria a livello intestinale ed inibire l'insorgenza delle principali patologie ad essi correlate (**Romier B. et al., 2009**).

I composti fenolici del vino hanno ricevuto in questi ultimi anni un interesse sempre maggiore a causa dei numerosi studi epidemiologici che hanno suggerito un'associazione tra un regolare consumo di dosi moderate di vino e la prevenzione di alcune malattie cronico/degenerative (**Deiana M. et al., 2012**).

Il vino è una buona fonte di composti fenolici; tipicamente un bicchiere di vino rosso contiene circa 100-200 mg di composti genericamente chiamati polifenoli (**Pandey K.B. and Rizvi S.I., 2009**).

Generalmente, i composti fenolici sono poco assorbiti, largamente metabolizzati e raramente raggiungono concentrazioni ematiche di rilievo; la maggior parte rimane a livello intestinale (**Scalbert A. and Williamson G., 2000; Walle T., 2004; Walle T. et al., 2005**) dove è verosimile che possano esercitare un'azione protettiva.

I loro effetti benefici sono stati per lo più associati alla loro attività antiossidante (**Deiana M. et al., 2012**), intesa non solo come attività di “scavenging” di radicali liberi, ma anche come capacità di modulare specifiche proteine segnale implicate nella regolazione genica in risposta allo stress ossidativo e all'infiammazione (**Fraga C.G. et al., 2010; Leonarduzzi G. et al., 2010**). Gli effetti induttivi o di segnalazione di solito si verificano a concentrazioni molto inferiori a quelle richieste per un'efficace attività antiossidante (**Virgili F. and Marino M., 2008**) ed è quindi probabile che siano i principali meccanismi d'azione *in vivo*.

In questo ambito si inserisce questo lavoro di ricerca volto a valutare l'attività antiossidante e anti-infiammatoria della frazione fenolica di due vini ottenuti da vitigni caratteristici della Sardegna, un vino rosso, il Cannonau, e un vino bianco, il Vermentino, in colture di cellule intestinali Caco-2 differenziate.

La linea cellulare di carcinoma intestinale umano Caco-2 è una delle poche in grado di esprimere i caratteri distintivi di una cellula enterocitica matura ed è ampiamente utilizzata come modello *in vitro* per studi sui meccanismi di assorbimento e metabolismo intestinale, di differenziamento e di tossicità (**Artursson P., 1990; Artursson P. and Magnusson C., 1990; Baker R.D. et al., 1995; Meunier V. et al., 1995; Artursson P. et al., 2001**).

Le Caco-2, fatte crescere in condizioni di coltura standard (ad es. in presenza di glucosio e siero), si differenziano spontaneamente e presentano caratteristiche morfologiche e funzionali di cellule di intestino tenue, divenendo cellule polarizzate con microvilli (**Pinto M. et al., 1983; Peters W.H. and Roelofs H.M., 1989; Youakin A. et al., 1989; Le Ferrec E. et al., 2001**) e formano spontaneamente un monostrato (**Pinto M. et al., 1983; Rousset M. et al., 1985**). Inoltre, una volta che si sono ben differenziate, possiedono, come le cellule intestinali, gli enzimi antiossidanti che metabolizzano i radicali dell'ossigeno: superossido dismutasi, glutatione perossidasi, glutatione reduttasi e catalasi (**Baker S.S. and Baker R.D., Jr., 1992; Baker S.S. and Baker R.D., Jr., 1993; Baker R.D. et al., 1995**).

Le cellule sono state trattate con una miscela di ossisteroli costituita dai principali ossisteroli presenti negli alimenti ricchi in colesterolo: 7- η -chetocolesterolo, 5 α ,6 α -epossicolesterolo, 5 β ,6 β -epossicolesterolo, 7 α -idrossicolesterolo e 7 β -idrossicolesterolo (**Kanner J., 2007**).

Questi prodotti di ossidazione sono sempre presenti negli alimenti in miscela (**Mascia C. et al., 2010**) e raggiungono concentrazioni che possono andare da 10 a 100 μ M nei diversi alimenti; il consumo di diversi alimenti contenenti ossisteroli potrebbe portare a concentrazioni luminali di tali prodotti molto superiori ai 100 μ M (**Kanner J., 2007**).

Da qui l'importanza di studiare l'effetto tossico degli ossisteroli in miscela, dato che sembrano esercitare effetti differenti a seconda che vengano somministrati in miscela o singolarmente, e a diverse concentrazioni (**Biasi F. et al., 2013a**).

A seconda delle condizioni sperimentali utilizzate (tempo di incubazione/concentrazione miscela di ossisteroli) abbiamo potuto osservare da un lato l'induzione di un danno ossidativo che ha portato le cellule a morte, dall'altro l'alterazione dello stato redox intracellulare che ha portato all'attivazione di quelle vie di segnalazione redox sensibili legate alla risposta cellulare allo stress ossidativo e all'induzione della risposta infiammatoria.

La produzione di malonildialdeide (MDA) è stata considerata come indice di danno ossidativo insieme alla morte cellulare; l'alterazione dello stato redox è stata valutata monitorando l'attività della GPx, la concentrazione del GSH, la produzione di ROS e l'attività dell'isoforma colonica della NADPH ossidasi (NOX), la NOX 1.

Il trattamento con la miscela di ossisteroli dopo 24 ore di incubazione ha indotto sia la morte cellulare che la produzione di MDA, indicando un avanzato processo ossidativo delle macromolecole cellulari.

Già dopo 30 minuti dal trattamento, si è osservato un crollo del GSH, in accordo con quanto riportato in letteratura in altri tipi cellulari; è stato, infatti, dimostrato che il 7- η -chetocolesterolo e il 7 β -idrossicolesterolo inducono una significativa diminuzione dei livelli di GSH nelle cellule PC12 e U937 (**Lizard G. et al., 1998; Lyons N.M. et al., 2001; O'Callaghan Y.C. et al., 2001; O'Callaghan Y.C. et al., 2002; Han J.H. et al., 2007**).

Tuttavia a seconda delle condizioni sperimentali utilizzate e al tipo cellulare, singoli ossisteroli o ossisteroli in miscela, possono esercitare effetti contrastanti sui livelli del GSH intracellulare (**O'Callaghan Y.C. et al., 2001; O'Callaghan Y.C. et al., 2002; O'Sullivan A J. et al., 2005**).

Nelle cellule pretrattate con gli estratti fenolici di vino il danno ossidativo è stato significativamente inibito e si è osservata una minore riduzione del GSH. I due vini hanno mostrato un'attività antiossidante equivalente nel range di concentrazioni utilizzate.

A 18 ore dal trattamento si è osservato un aumento dell'attività della GPx, che insieme ad altri enzimi come la superossido dismutasi e la catalasi, fa parte del sistema di detossificazione delle specie radicaliche responsabili del danno ossidativo cellulare. Il pretrattamento con gli estratti fenolici ha portato ad un ulteriore aumento dell'attività enzimatica, in accordo con quanto riportato in letteratura sull'azione che alcuni composti fenolici esplicano su diversi enzimi dei quali controllano l'espressione e la sintesi (**Moskaug J.O. et al., 2005; Martin M.A. et al., 2010**).

Infatti, molti dati sperimentali dimostrano che sistemi cellulari, trattati con polifenoli, presentano un aumento delle attività enzimatiche correlate al GSH, in particolare della γ GCS, della GRed, della GPx e della GST (**Steele V.E. et al., 2000; Jeon S.E. et al., 2003; Molina M.F. et al., 2003; Ramirez-Mares M.V. and de Mejia E.G., 2003; Scharf G. et al., 2003; Soto C. et al., 2003**). Effetti dei polifenoli sulle attività enzimatiche correlate al GSH, in particolare sulla GPx, sono stati dimostrati anche in studi *in vivo*, sia in modelli animali che nell'uomo (**Rodrigo R. et al., 2002; Khan N. and Sultana S., 2004; Fitò M. et al., 2005; Rodrigo R. et al., 2005**). Uno dei meccanismi attraverso i quali i polifenoli esercitano tali effetti sembra essere un'azione diretta sull'espressione genica degli enzimi (**Giovannini C. et al., 2006**).

L'alterazione dello stato redox cellulare fino all'induzione del danno ossidativo è almeno in parte dovuta alla generazione di ROS da parte degli ossisteroli, come dimostrato dalle prove effettuate con la diclorofluoresceina diacetato (DCFH-DA); abbiamo infatti osservato un marcato aumento della fluorescenza nei campioni trattati con gli ossisteroli rispetto ai controlli.

È stato riportato che la generazione di ROS intracellulari indotta dagli ossisteroli può essere mediata dall'attivazione della NOX in diversi sistemi cellulari (**Palozza P. et al., 2011; Biasi F. et al., 2013a**). Nelle cellule Caco-2 trattate con una miscela di ossisteroli equivalente alla nostra è stato dimostrato che la produzione di ROS è mediata da una marcata attivazione dell'isoforma NOX1 (**Biasi F. et al., 2009**).

Siamo andati quindi a valutare l'attività di questo enzima nelle nostre condizioni sperimentali e abbiamo avuto conferma che la miscela di ossisteroli è in grado di indurre un significativo incremento dell'attività della NOX1.

Il pretrattamento con gli estratti fenolici ha ridotto la formazione di ROS, probabilmente attraverso una diretta azione di "scavenging", ma anche attraverso la modulazione dell'attività della NOX1, che è stata significativamente inibita in presenza degli estratti fenolici.

È riportato in letteratura che, modulando le diverse isoforme della NOX, gli ossisteroli esercitano un'azione pro-infiammatoria, inducendo la sintesi di interleuchine.

Palozza e colleghi hanno infatti dimostrato che in macrofagi THP-1, il 7-chetocolesterolo e il 25 idrossicolesterolo aumentano i livelli di mRNA e la secrezione delle citochine infiammatorie (IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF α) e questi effetti sono stati associati ad un'aumentata produzione di ROS attraverso un'aumentata espressione della NOX-4 (**Palozza P. et al., 2011**). È stato inoltre dimostrato che l'induzione dell'IL-8 da parte del colesterolo e di una miscela di ossisteroli, corrispondente a quella da noi utilizzata, in cellule Caco-2 differenziate è legata ad un'aumentata regolazione della NOX1 (**Mascia C. et al., 2010**).

Abbiamo quindi voluto valutare se nelle nostre condizioni sperimentali il trattamento con gli ossisteroli inducesse la secrezione di IL-6 e IL-8, mediatori cruciali nel sostenere l'infiammazione cronica intestinale, come dimostrato in modelli *in vitro* e nell'uomo (**Biasi F. et al., 2013b**).

Abbiamo osservato che gli ossisteroli inducono la sintesi delle interleuchine attraverso l'attivazione della NOX come confermato dal fatto che il trattamento con diphenyl iodonium (DPI, inibitore della NOX) ne inibisce la sintesi. L'estratto fenolico di Cannonau ha mostrato un significativo effetto anti-infiammatorio, inibendo la secrezione delle citochine.

È stato suggerito che gli ossisteroli possono incrementare i livelli di ROS, che a concentrazioni moderate, possono agire come secondi messaggeri nella trasduzione del segnale attraverso la modulazione di MAPKs redox sensibili e influenzando l'attivazione di fattori di trascrizione redox sensibili come NF-kB (**Palozza P. et al., 2011**); in letteratura tuttavia non sono presenti lavori riguardanti la modulazione delle MAPKs ERK, p38 e JNK da parte degli ossisteroli nelle cellule intestinali Caco-2.

Nelle nostre condizioni sperimentali, gli ossisteroli non sono risultati in grado di modulare la fosforilazione di ERK, mentre hanno aumentato la fosforilazione di JNK e p38, che raggiunge un massimo intorno alle 2 ore dal trattamento. Recenti studi hanno dimostrato che la via di

segnalazione di JNK, classicamente legata all'induzione dell'apoptosi, svolge un ruolo importante nell'effetto pro-aterogeno e pro-infiammatorio di alcuni ossisteroli, in particolare del 7- β -chetocolesterolo (**Pedruzzi E. et al., 2004**).

E' stato anche dimostrato che l'azione pro-infiammatoria di alcuni ossisteroli (il 22-idrossicolesterolo e l' α -triolo) è mediata dall'attivazione di p38 (**Yoon J.H. et al., 2004; Liao P.L. et al., 2009**).

L'attivazione di p38 è un punto chiave della risposta infiammatoria a livello intestinale, poiché, sia nelle cellule del sistema immunitario che in quelle strutturali della parete intestinale, regola l'espressione di diverse citochine pro-infiammatorie (IL-6, IL-8, COX-2, ecc.), attraverso la modulazione di fattori di trascrizione, come NF- κ B, o la modulazione della stabilità e traduzione degli specifici mRNA (**Feng Y.J. and Li Y.Y., 2011**). L'azione pro-infiammatoria della miscela di ossisteroli utilizzata nelle nostre condizioni sperimentali, potrebbe dunque passare attraverso l'attivazione della NOX1 e la produzione di ROS, la modulazione di p38 e JNK e l'induzione del rilascio delle IL-6 e IL-8. Il meccanismo tuttavia potrebbe essere più complesso, interessando vie di segnalazione parallele e/o comportando la simultanea attivazione di più vie.

Nelle cellule pretrattate con gli estratti fenolici di vino, l'attivazione di p38 e JNK da parte degli ossisteroli è significativamente minore. Gli stessi composti fenolici presenti negli estratti sono in grado di modulare la fosforilazione di p38 e JNK, che risulta aumentata nelle cellule trattate con i soli estratti, in accordo con quanto riportato in altri tipi cellulari (**Briviba K. et al., 2002; Ndiaye M. et al., 2004**). Sono numerosi i lavori che dimostrano una spiccata attività modulatrice di diverse classi di composti fenolici sulle MAPKs, la cui attività può essere inibita o aumentata a seconda del tipo cellulare e delle condizioni sperimentali (**Santangelo C. et al., 2007**).

Sono necessari ulteriori studi per chiarire il meccanismo mediante il quale i composti fenolici esplicano la loro azione protettiva; tuttavia, dai dati ottenuti nel nostro sistema sperimentale, si può ipotizzare che questi composti agiscano principalmente contrastando le fasi iniziali dell'azione pro-ossidante e pro-infiammatoria degli ossisteroli, inibendo la formazione di ROS e quindi tutti gli effetti a cascata successivi.

Questo possibile meccanismo è in accordo con quanto riportato in cellule macrofagiche nelle quali il licopene è risultato in grado di prevenire l'incremento dell'espressione e della secrezione delle citochine pro-infiammatorie IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF α indotto dagli

ossisteroli. Tale effetto è stato accompagnato da un'inibizione della produzione di ROS attraverso un'aumentata espressione della NOX, della fosforilazione di ERK1/2, p38 e JNK e dell'attivazione di NF-kB indotti dagli ossisteroli. Anche in questo caso è stato proposto un potenziale ruolo del licopene nella prevenzione della produzione delle citochine pro-infiammatorie indotta dagli ossisteroli e che questo avvenga attraverso un meccanismo che coinvolge l'inibizione della NOX, che a sua volta influenza la produzione di ROS e l'espressione delle MAPKs redox sensibili e di conseguenza l'attivazione di NF-kB (**Palozza P. et al., 2011**).

Ulteriori evidenze a sostegno del meccanismo che abbiamo ipotizzato sono rappresentate dal fatto che è stato dimostrato che la secrezione di IL-8 indotta dagli ossisteroli è associata con l'attivazione della via di segnalazione MEK/ERK1/2 (**Ares M.P.S. et al., 2000**) ed NF-kB è stato coinvolto come mediatore dell'induzione di chemochine da parte degli ossisteroli in cellule U937 (**Leonarduzzi G. et al., 2005**). Inoltre, è stata riportata in macrofagi umani l'efficacia del 7-chetocolesterolo nell'induzione della produzione di ROS attraverso l'incremento dell'espressione della NOX4 e dell'attivazione di ERK1/2, p38 e JNK (**Palozza P. et al., 2010**). Infine, altri studi hanno dimostrato che il 7-chetocolesterolo e il 25-idrossicolesterolo agiscono modulando i livelli di NOX (**Pedrucci E. et al., 2004; Palozza P. et al., 2007; Lee W.H. et al., 2009**).

I risultati di questo studio dimostrano nel loro insieme un'azione protettiva, antiossidante e antiinfiammatoria, della frazione fenolica del vino nei confronti delle cellule intestinali CaCo-2, suggerendo un probabile effetto preventivo nelle patologie intestinali legate allo stress ossidativo e all'infiammazione. Entrambi i vini hanno dimostrato di essere efficaci; nonostante l'estratto di vino rosso si sia rivelato più attivo, probabilmente perché più ricco di sostanze fenoliche e caratterizzato dalla presenza degli antociani, quello di vino bianco ha dimostrato di avere nella maggior parte delle nostre condizioni sperimentali un'attività comparabile, ad ulteriore conferma che l'elevata concentrazione fenolica di un estratto non è cruciale per la sua attività biologica, ma dipende dalle strutture molecolari dei singoli composti fenolici presenti e dalla possibile sinergia o antagonismo tra le differenti classi di composti (**Deiana M. et al., 2012**).

6 BIBLIOGRAFIA

- Actis-Goretta L., Ottaviani J.I., Keen C.L. and Fraga C.G. (2003). Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) activity by flavan-3-ols and procyanidins. *FEBS Lett*, 555 (3): 597-600.
- Adachi J., Kudo R., Ueno Y., Hunter R., Rajendram R., Want E. and Preedy V.R. (2001). Heart 7-hydroperoxycholesterol and oxysterols are elevated in chronically ethanol-fed rats. *J Nutr*, 131 (11): 2916-2920.
- Adachi Y., Shibai Y., Mitsushita J., Shang W.H., Hirose K. and Kamata T. (2008). Oncogenic Ras upregulates NADPH oxidase 1 gene expression through MEK-ERK-dependent phosphorylation of GATA-6. *Oncogene*, 27 (36): 4921-4932.
- Agassandian M., Zhou J., Tephly L.A., Ryan A.J., Carter A.B. and Mallampalli R.K. (2005). Oxysterols inhibit phosphatidylcholine synthesis via ERK docking and phosphorylation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase. *J Biol Chem*, 280 (22): 21577-21587.
- Agullo G., Gamet-Payraastre L., Manenti S., Viala C., Remesy C., Chap H. and Payraastre B. (1997). Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: a comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. *Biochem Pharmacol*, 53 (11): 1649-1657.
- Aldini G., Carini M., Piccoli A., Rossoni G. and Facino R.M. (2003). Procyanidins from grape seeds protect endothelial cells from peroxynitrite damage and enhance endothelium-dependent relaxation in human artery: new evidences for cardio-protection. *Life Sci*, 73 (22): 2883-2898.
- Aleman L., Laparra J.M., Barbera R. and Alegria A. (2012). Evaluation of the cytotoxic effect of 7keto-stigmasterol and 7keto-cholesterol in human intestinal (Caco-2) cells. *Food Chem Toxicol*, 50 (9): 3106-3113.
- Allen R.G. and Tresini M. (2000). Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med*, 28 (3): 463-499.
- Altenhofer S., Kleikers P.W., Radermacher K.A., Scheurer P., Rob Hermans J.J., Schiffers P., Ho H., Wingler K. and Schmidt H.H. (2012). The NOX toolbox: validating the role of NADPH oxidases in physiology and disease. *Cell Mol Life Sci*, 69 (14): 2327-2343.
- Ames B.N. (1983). Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science*, 221 (4617): 1256-1264.
- Antonio V., Janvier B., Brouillet A., Andreani M. and Raymondjean M. (2003). Oxysterol and 9-cis-retinoic acid stimulate the group IIA secretory phospholipase A2 gene in rat smooth-muscle cells. *Biochem J*, 376 (Pt 2): 351-360.
- Aon M.A., Cortassa S., Maack C. and O'Rourke B. (2007). Sequential opening of mitochondrial ion channels as a function of glutathione redox thiol status. *J Biol Chem*, 282 (30): 21889-21900.
- Ares M.P.S., Porn-Ares M.I., Moses S., Thyberg J., Juntti-Berggren L., Berggren P., Hultgardh- Nilsson A., Kallin B. and Nilsson J. (2000). 7beta-hydroxycholesterol induces Ca(2+) oscillations, MAP kinase activation and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, 153 (1): 23-35.
- Armstrong J.S. and Jones D.P. (2002). Glutathione depletion enforces the mitochondrial permeability transition and causes cell death in Bcl-2 overexpressing HL60 cells. *FASEB J*, 16 (10): 1263-1265.

- Arndt H., Palitzsch K.D., Anderson D.C., Rusche J., Grisham M.B. and Granger D.N. (1995). Leucocyte-endothelial cell adhesion in a model of intestinal inflammation. *Gut*, 37 (3): 374-379.
- Artursson P. (1990). Epithelial transport of drugs in cell culture. I: A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (Caco-2) cells. *J Pharm Sci*, 79 (6): 476-482.
- Artursson P. and Magnusson C. (1990). Epithelial transport of drugs in cell culture. II: Effect of extracellular calcium concentration on the paracellular transport of drugs of different lipophilicities across monolayers of intestinal epithelial (Caco-2) cells. *J Pharm Sci*, 79 (7): 595-600.
- Artursson P., Palm K. and Luthman K. (2001). Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Deliv Rev*, 46 (1-3): 27-43.
- Avissar N., Ornt D.B., Yagil Y., Horowitz S., Watkins R.H., Kerl E.A., Takahashi K., Palmer I.S. and Cohen H.J. (1994). Human kidney proximal tubules are the main source of plasma glutathione peroxidase. *Am J Physiol*, 266 (2 Pt 1): C367-375.
- Aw T.Y. (1994). Biliary glutathione promotes the mucosal metabolism of luminal peroxidized lipids by rat small intestine in vivo. *J Clin Invest*, 94 (3): 1218-1225.
- Aw T.Y. (1999). Molecular and cellular responses to oxidative stress and changes in oxidation-reduction imbalance in the intestine. *Am J Clin Nutr*, 70 (4): 557-565.
- Aw T.Y. (2003). Cellular redox: a modulator of intestinal epithelial cell proliferation. *News Physiol Sci*, 18: 201-204.
- Aw T.Y. (2005). Intestinal glutathione: determinant of mucosal peroxide transport, metabolism, and oxidative susceptibility. *Toxicol Appl Pharmacol*, 204 (3): 320-328.
- Aw T.Y. and Rhoads C.A. (1994). Glucose regulation of hydroperoxide metabolism in rat intestinal cells. Stimulation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate supply. *J Clin Invest*, 94 (6): 2426-2434.
- Aw T.Y., Wierzbicka G. and Jones D.P. (1991). Oral glutathione increases tissue glutathione in vivo. *Chem Biol Interact*, 80 (1): 89-97.
- Aw T.Y. and Williams M.W. (1992). Intestinal absorption and lymphatic transport of peroxidized lipids in rats: effect of exogenous GSH. *Am J Physiol*, 263 (5 Pt 1): G665-672.
- Aw T.Y., Williams M.W. and Gray L. (1992). Absorption and lymphatic transport of peroxidized lipids by rat small intestine in vivo: role of mucosal GSH. *Am J Physiol*, 262 (1 Pt 1): G99-106.
- Babiker A. and Diczfalusy U. (1998). Transport of side-chain oxidized oxysterols in the human circulation. *Biochim Biophys Acta*, 1392 (2-3): 333-339.
- Bai B., Yamamoto K., Sato H., Sugiura H. and Tanaka T. (2005). Combined effect of 25-hydroxycholesterol and IL-1beta on IL-8 production in human colon carcinoma cell line (Caco-2). *Inflammation*, 29 (4-6): 141-146.
- Baker R.D., Baker S.S. and LaRosa K. (1995). Polarized Caco-2 cells. Effect of reactive oxygen metabolites on enterocyte barrier function. *Dig Dis Sci*, 40 (3): 510-518.

- Baker S.S. and Baker R.D., Jr. (1992). Antioxidant enzymes in the differentiated Caco-2 cell line. In *Vitro Cell Dev Biol*, 28A (9-10): 643-647.
- Baker S.S. and Baker R.D., Jr. (1993). Caco-2 cell metabolism of oxygen-derived radicals. *Dig Dis Sci*, 38 (12): 2273-2280.
- Ballatori N., Krance S.M., Notenboom S., Shi S., Tieu K. and Hammond C.L. (2009). Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem*, 390 (3): 191-214.
- Ballatori N. and Rebbear J.F. (1998). Roles of MRP2 and oatp1 in hepatocellular export of reduced glutathione. *Semin Liver Dis*, 18 (4): 377-387.
- Banfi B., Maturana A., Jaconi S., Arnaudeau S., Laforge T., Sinha B., Ligeti E., Demareux N. and Krause K.H. (2000). A mammalian H⁺ channel generated through alternative splicing of the NADPH oxidase homolog NOH-1. *Science*, 287 (5450): 138-142.
- Banning A., Florian S., Deubel S., Thalmann S., Muller-Schmehl K., Jacobasch G. and Brigelius-Flohé R. (2008). GPx2 counteracts PGE2 production by dampening COX-2 and mPGES-1 expression in human colon cancer cells. *Antioxid Redox Signal*, 10 (9): 1491-1500.
- Barrett C.W., Ning W., Chen X., Smith J.J., Washington M.K., Hill K.E., Coburn L.A., Peek R.M., Chaturvedi R., Wilson K.T., Burk R.F. and Williams C.S. (2013). Tumor suppressor function of the plasma glutathione peroxidase Gpx3 in colitis-associated carcinoma. *Cancer Res*, 73 (3): 1245-1255.
- Barros A.I.R.N.A., Nunes F.M., Goncalves B., Bennett R.N. and Silva A.P. (2011). Effect of cooking on total vitamin C contents and antioxidant activity of sweet chestnuts (*Castanea sativa* Mill.). *Food Chem.*, 128: 165-172.
- Bass R., Ruddock L.W., Klappa P. and Freedman R.B. (2004). A major fraction of endoplasmic reticulum-located glutathione is present as mixed disulfides with protein. *J Biol Chem*, 279 (7): 5257-5262.
- Ben-Levy R., Hooper S., Wilson R., Paterson H.F. and Marshall C.J. (1998). Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2. *Curr Biol*, 8 (19): 1049-1057.
- Berggren M., Gallegos A., Gasdaska J.R., Gasdaska P.Y., Warneke J. and Powis G. (1996). Thioredoxin and thioredoxin reductase gene expression in human tumors and cell lines, and the effects of serum stimulation and hypoxia. *Anticancer Res*, 16 (6B): 3459-3466.
- Berliner J.A. and Heinecke J.W. (1996). The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic Biol Med*, 20 (5): 707-727.
- Berthier A., Lemaire-Ewing S., Prunet C., Montange T., Vejux A., Pais de Barros J.P., Monier S., Gambert P., Lizard G. and Neel D. (2005). 7-Ketocholesterol-induced apoptosis. Involvement of several pro-apoptotic but also anti-apoptotic calcium-dependent transduction pathways. *FEBS J*, 272 (12): 3093-3104.
- Biasi F., Chiarpotto E., Sottero B., Maina M., Mascia C., Guina T., Gamba P., Gargiulo S., Testa G., Leonarduzzi G. and Poli G. (2013a). Evidence of cell damage induced by major components of a diet-compatible mixture of oxysterols in human colon cancer CaCo-2 cell line. *Biochimie*, 95 (3): 632-640.

- Biasi F., Guina T., Maina M., Cabboi B., Deiana M., Tuberoso C.I., Calfapietra S., Chiarpotto E., Sottero B., Gamba P., Gargiulo S., Brunetto V., Testa G., Dessi M.A., Poli G. and Leonarduzzi G. (2013b). Phenolic compounds present in Sardinian wine extracts protect against the production of inflammatory cytokines induced by oxysterols in CaCo-2 human enterocyte-like cells. *Biochem Pharmacol*, 86 (1): 138-145.
- Biasi F., Leonarduzzi G., Oteiza P.I. and Poli G. (2013c). Inflammatory bowel disease: mechanisms, redox considerations, and therapeutic targets. *Antioxid Redox Signal*, 19 (14): 1711-1747.
- Biasi F., Leonarduzzi G., Vizio B., Zanetti D., Sevanian A., Sottero B., Verde V., Zingaro B., Chiarpotto E. and Poli G. (2004). Oxysterol mixtures prevent proapoptotic effects of 7-ketocholesterol in macrophages: implications for proatherogenic gene modulation. *FASEB J*, 18 (6): 693-695.
- Biasi F., Mascia C., Astegiano M., Chiarpotto E., Nano M., Vizio B., Leonarduzzi G. and Poli G. (2009). Pro-oxidant and proapoptotic effects of cholesterol oxidation products on human colonic epithelial cells: a potential mechanism of inflammatory bowel disease progression. *Free Radic Biol Med*, 47 (12): 1731-1741.
- Biasi F., Mascia C. and Poli G. (2007). TGF β 1 expression in colonic mucosa: modulation by dietary lipids. *Genes Nutr*, 2 (2): 233-243.
- Biasi F., Mascia C. and Poli G. (2008). The contribution of animal fat oxidation products to colon carcinogenesis, through modulation of TGF- β 1 signaling. *Carcinogenesis*, 29 (5): 890-894.
- Birt D.F., Hendrich S. and Wang W. (2001). Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol Ther*, 90 (2-3): 157-177.
- Bjorkhem I. (2006). Crossing the barrier: oxysterols as cholesterol transporters and metabolic modulators in the brain. *J Intern Med*, 260 (6): 493-508.
- Bjorkhem I. (2007). Rediscovery of cerebrosterol. *Lipids*, 42 (1): 5-14.
- Bjorkhem I., Andersson O., Diczfalusy U., Sevastik B., Xiu R.J., Duan C. and Lund E. (1994). Atherosclerosis and sterol 27-hydroxylase: evidence for a role of this enzyme in elimination of cholesterol from human macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91 (18): 8592-8596.
- Blanco R.A., Ziegler T.R., Carlson B.A., Cheng P.Y., Park Y., Cotsonis G.A., Accardi C.J. and Jones D.P. (2007). Diurnal variation in glutathione and cysteine redox states in human plasma. *Am J Clin Nutr*, 86 (4): 1016-1023.
- Bode A.M. and Dong Z. (2007). The functional contrariety of JNK. *Mol Carcinog*, 46 (8): 591-598.
- Bogoyevitch M.A., Ngoei K.R., Zhao T.T., Yeap Y.Y. and Ng D.C. (2010). c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling: recent advances and challenges. *Biochim Biophys Acta*, 1804 (3): 463-475.
- Borenfreund E. and Puerner J.A. (1984). A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assay (HTD/NR-90). *Journal of tissue culture methods*, 9: 7-9.
- Bors W., Michel C. and Stettmaier K. (2001). Structure-activity relationships governing antioxidant capacities of plant polyphenols. *Methods Enzymol*, 335:166-180.
- Boulton T.G., Yancopoulos G.D., Gregory J.S., Slaughter C., Moomaw C., Hsu J. and Cobb M.H. (1990). An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science*, 249 (4964): 64-67.

- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248-254.
- Brigelius-Flohé R. (1999). Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med*, 27 (9-10): 951-965.
- Brigelius-Flohé R. and Kipp A. (2009). Glutathione peroxidases in different stages of carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1790 (11): 1555-1568.
- Brigelius-Flohé R. and Maiorino M. (2013). Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta*, 1830 (5): 3289-3303.
- Briviba K., Pan L. and Rechkemmer G. (2002). Red wine polyphenols inhibit the growth of colon carcinoma cells and modulate the activation pattern of mitogen-activated protein kinases. *J Nutr*, 132 (9): 2814-2818.
- Brouillard R., George F. and Fougèrouse A. (1997). Polyphenols produced during red wine ageing. *Biofactors*, 6 (4): 403-410.
- Brown A.J. and Jessup W. (1999). Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 142 (1): 1-28.
- Brown A.J. and Jessup W. (2009). Oxysterols: Sources, cellular storage and metabolism, and new insights into their roles in cholesterol homeostasis. *Mol Aspects Med*, 30 (3): 111-122.
- Brown D.I. and Griendling K.K. (2009). Nox proteins in signal transduction. *Free Radic Biol Med*, 47 (9): 1239-1253.
- Brown M.S. and Goldstein J.L. (1974). Suppression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity and inhibition of growth of human fibroblasts by 7-ketocholesterol. *J Biol Chem*, 249 (22): 7306-7314.
- Burk R.F., Olson G.E., Winfrey V.P., Hill K.E. and Yin D. (2011). Glutathione peroxidase-3 produced by the kidney binds to a population of basement membranes in the gastrointestinal tract and in other tissues. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 301 (1): G32-38.
- Burton G.W. and Traber M.G. (1990). Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. *Annu Rev Nutr*, 10: 357-382.
- Buxade M., Parra-Palau J.L. and Proud C.G. (2008). The Mnks: MAP kinase-interacting kinases (MAP kinase signal-integrating kinases). *Front Biosci*, 13: 5359-5373.
- Caballero F., Fernandez A., Matias N., Martinez L., Fucho R., Elena M., Caballeria J., Morales A., Fernandez-Checa J.C. and Garcia-Ruiz C. (2010). Specific contribution of methionine and choline in nutritional nonalcoholic steatohepatitis: impact on mitochondrial S-adenosyl-L-methionine and glutathione. *J Biol Chem*, 285 (24): 18528-18536.
- Cabras P. (2004). *Vino*. In *Chimica degli alimenti*. Cabras P. and Martelli A. Eds. PICCIN, Padova: 521-545.
- Canals S., Casarejos M.J., de Bernardo S., Solano R.M. and Mena M.A. (2003). Selective and persistent activation of extracellular signal-regulated protein kinase by nitric oxide in glial cells induces neuronal degeneration in glutathione-depleted midbrain cultures. *Mol Cell Neurosci*, 24 (4): 1012-1026.
- Cargnello M. and Roux P.P. (2011). Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev*, 75 (1): 50-83.

- Carocho M. and Ferreira I.C. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol*, 51: 15-25.
- Carratù B. and Sanzini E. (2005). [Biologically-active phytochemicals in vegetable food]. *Ann Ist Super Sanità*, 41 (1): 7-16.
- Cave A.C., Brewer A.C., Narayanapanicker A., Ray R., Grieve D.J., Walker S. and Shah A.M. (2006). NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. *Antioxid Redox Signal*, 8 (5-6): 691-728.
- Celotti F. (2002). Le malattie del tratto gastrointestinale e del peritoneo. In *Patologia generale e fisiopatologia*. Celotti F.E. Ed. EdiSES, Napoli: 483-536.
- Chen R.H., Sarnecki C. and Blenis J. (1992). Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol Cell Biol*, 12 (3): 915-927.
- Chen X.J. and Butow R.A. (2005). The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nat Rev Genet*, 6 (11): 815-825.
- Chen Z. and Lash L.H. (1998). Evidence for mitochondrial uptake of glutathione by dicarboxylate and 2-oxoglutarate carriers. *J Pharmacol Exp Ther*, 285 (2): 608-618.
- Chisolm G.M. and Steinberg D. (2000). The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radic Biol Med*, 28 (12): 1815-1826.
- Chu F.F., Doroshow J.H. and Esworthy R.S. (1993). Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *J Biol Chem*, 268 (4): 2571-2576.
- Chu F.F., Esworthy R.S., Chu P.G., Longmate J.A., Huycke M.M., Wilczynski S. and Doroshow J.H. (2004). Bacteria-induced intestinal cancer in mice with disrupted Gpx1 and Gpx2 genes. *Cancer Res*, 64 (3): 962-968.
- Circu M.L. and Aw T.Y. (2008). Glutathione and apoptosis. *Free Radic Res*, 42 (8): 689-706.
- Circu M.L. and Aw T.Y. (2010). Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med*, 48 (6): 749-762.
- Circu M.L. and Aw T.Y. (2011). Redox biology of the intestine. *Free Radic Res*, 45 (11-12): 1245-1266.
- Circu M.L. and Aw T.Y. (2012). Intestinal redox biology and oxidative stress. *Semin Cell Dev Biol*, 23 (7): 729-737.
- Circu M.L., Moyer M.P., Harrison L. and Aw T.Y. (2009). Contribution of glutathione status to oxidant-induced mitochondrial DNA damage in colonic epithelial cells. *Free Radic Biol Med*, 47 (8): 1190-1198.
- Circu M.L., Rodriguez C., Maloney R., Moyer M.P. and Aw T.Y. (2008). Contribution of mitochondrial GSH transport to matrix GSH status and colonic epithelial cell apoptosis. *Free Radic Biol Med*, 44 (5): 768-778.
- Coant N., Ben Mkaddem S., Pedruzzi E., Guichard C., Treton X., Ducroc R., Freund J.N., Cazals-Hatem D., Bouhnik Y., Woerther P.L., Skurnik D., Grodet A., Fay M., Biard D., Lesuffleur T., Deffert C., Moreau R., Groyer A., Krause K.H., Daniel F. and Ogier-Denis E. (2010).

- NADPH oxidase 1 modulates WNT and NOTCH1 signaling to control the fate of proliferative progenitor cells in the colon. *Mol Cell Biol*, 30 (11): 2636-2650.
- Colles S.M., Maxson J.M., Carlson S.G. and Chisolm G.M. (2001). Oxidized LDL-induced injury and apoptosis in atherosclerosis. Potential roles for oxysterols. *Trends Cardiovasc Med*, 11 (3-4): 131-138.
- Comhair S.A., Bhatena P.R., Farver C., Thunnissen F.B. and Erzurum S.C. (2001). Extracellular glutathione peroxidase induction in asthmatic lungs: evidence for redox regulation of expression in human airway epithelial cells. *FASEB J*, 15 (1): 70-78.
- Corder R., Mullen W., Khan N.Q., Marks S.C., Wood E.G., Carrier M.J. and Crozier A. (2006). Oenology: red wine procyanidins and vascular health. *Nature*, 444 (7119): 566.
- Cortell J.M. and Kennedy J.A. (2006). Effect of shading on accumulation of flavonoid compounds in (*Vitis vinifera* L.) pinot noir fruit and extraction in a model system. *J Agric Food Chem*, 54 (22): 8510-8520.
- Cuadrado A. and Nebreda A.R. (2010). Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J*, 429 (3): 403-417.
- Cuenda A. and Rousseau S. (2007). p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1773 (8): 1358-1375.
- D'Archivio M., Filesi C., Di Benedetto R., Gargiulo R., Giovannini C. and Masella R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanità*, 43 (4): 348-361.
- Dahm L.J. and Jones D.P. (1994). Secretion of cysteine and glutathione from mucosa to lumen in rat small intestine. *Am J Physiol*, 267 (2 Pt 1): G292-300.
- Dahm L.J. and Jones D.P. (2000). Rat jejunum controls luminal thiol-disulfide redox. *J Nutr*, 130 (11): 2739-2745.
- Danielsson H., Kalles I. and Wikvall K. (1984). Regulation of hydroxylations in biosynthesis of bile acids. Isolation of a protein from rat liver cytosol stimulating reconstituted cholesterol 7 alpha-hydroxylase activity. *J Biol Chem*, 259 (7): 4258-4262.
- Darmanyan A.P., Gregory D.D., Guo Y., Jenks W.S., Burel L., Eloy D. and Jardon P. (1998). Quenching of singlet oxygen by oxygen- and sulfur-centered radicals: evidence for energy transfer to peroxy radicals in solution. *J. Am. Chem. Soc.*, 120: 396-403.
- de Weille J., Fabre C. and Bakalara N. (2013). Oxysterols in cancer cell proliferation and death. *Biochem Pharmacol*, 86 (1): 154-160.
- Dear T.N., Campbell K. and Rabbitts T.H. (1991). Molecular cloning of putative odorant-binding and odorant-metabolizing proteins. *Biochemistry*, 30 (43): 10376-10382.
- Deiana M., Loru D., Incani A., Rosa A., Atzeri A., Melis M.P., Cabboi B., Hollecker L., Pinna M.B., Argiolas F., Murru M. and Dessi M.A. (2012). Wine extracts from Sardinian grape varieties attenuate membrane oxidative damage in Caco-2 cell monolayers. *Food Chem*, 134 (4): 2105-2113.
- Dhanasekaran D.N. and Reddy E.P. (2008). JNK signaling in apoptosis. *Oncogene*, 27 (48): 6245-6251.

- Dickinson D.A. and Forman H.J. (2002). Glutathione in defense and signaling: lessons from a small thiol. *Ann N Y Acad Sci*, 973: 488-504.
- Dixon B.M., Heath S.H., Kim R., Suh J.H. and Hagen T.M. (2008). Assessment of endoplasmic reticulum glutathione redox status is confounded by extensive ex vivo oxidation. *Antioxid Redox Signal*, 10 (5): 963-972.
- Dugas B., Charbonnier S., Baarine M., Ragot K., Delmas D., Menetrier F., Lherminier J., Malvitte L., Khalfaoui T., Bron A., Creuzot-Garcher C., Latruffe N. and Lizard G. (2010). Effects of oxysterols on cell viability, inflammatory cytokines, VEGF, and reactive oxygen species production on human retinal cells: cytoprotective effects and prevention of VEGF secretion by resveratrol. *Eur J Nutr*, 49 (7): 435-446.
- Edwards P.A., Kennedy M.A. and Mak P.A. (2002). LXRs; oxysterol-activated nuclear receptors that regulate genes controlling lipid homeostasis. *Vascul Pharmacol*, 38 (4): 249-256.
- Es-Safi N.E., Cheynier V. and Moutounet M. (2002). Interactions between cyanidin 3-O-glucoside and furfural derivatives and their impact on food color changes. *J Agric Food Chem*, 50 (20): 5586-5595.
- Evangelisti F. (2003). Le modificazioni dei nutrienti indotte dai processi di lavorazione. In *Prodotti Dietetici - Chimica Tecnologia ed Impiego*. Evangelisti F. and Restani P. Eds. Piccin, Padova, 131-161.
- Fairfield K.M. and Fletcher R.H. (2002). Vitamins for chronic disease prevention in adults: scientific review. *JAMA*, 287 (23): 3116-3126.
- Fan C., Kawai Y., Inaba S., Arakawa K., Katsuyama M., Kajinami K., Yasuda T., Yabe-Nishimura C., Konoshita T. and Miyamori I. (2008). Synergy of aldosterone and high salt induces vascular smooth muscle hypertrophy through up-regulation of NOX1. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 111 (1-2): 29-36.
- Federico A., Morgillo F., Tuccillo C., Ciardiello F. and Loguercio C. (2007). Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. *Int J Cancer*, 121 (11): 2381-2386.
- Feng Y.J. and Li Y.Y. (2011). The role of p38 mitogen-activated protein kinase in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *J Dig Dis*, 12 (5): 327-332.
- Ferderbar S., Pereira E.C., Apolinario E., Bertolami M.C., Faludi A., Monte O., Calliari L.E., Sales J.E., Gagliardi A.R., Xavier H.T. and Abdalla D.S. (2007). Cholesterol oxides as biomarkers of oxidative stress in type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev*, 23 (1): 35-42.
- Fernandes A.P. and Holmgren A. (2004). Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxid Redox Signal*, 6 (1): 63-74.
- Fischer P.M. and Lane D.P. (2000). Inhibitors of cyclin-dependent kinases as anti-cancer therapeutics. *Curr Med Chem*, 7 (12): 1213-1245.
- Fitò M., Cladellas M., de la Torre R., Martí J., Alcantara M., Pujadas-Bastardes M., Marrugat J., Bruguera J., Lopez-Sabater M.C., Vila J. and Covas M.I. (2005). Antioxidant effect of virgin olive oil in patients with stable coronary heart disease: a randomized, crossover, controlled, clinical trial. *Atherosclerosis*, 181 (1): 149-158.
- Flohé L. (1989). *The Selenoprotein Glutathione Peroxidase*. John Wiley & Sons Inc..

- Flohé L. and Brigelius-Flohè R. (2006). Selenoproteins of the glutathione system. In *Selenium. Its Molecular Biology and Role in Human Health*. Hatfield D.I. Ed. Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht, London: 161-172.
- Flohé L., Gunzler W.A. and Schock H.H. (1973). Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett*, 32 (1): 132-134.
- Florian S., Wingler K., Schmehl K., Jacobasch G., Kreuzer O.J., Meyerhof W. and Brigelius-Flohe R. (2001). Cellular and subcellular localization of gastrointestinal glutathione peroxidase in normal and malignant human intestinal tissue. *Free Radic Res*, 35 (6): 655-663.
- Fraga C.G., Galleano M., Verstraeten S.V. and Oteiza P.I. (2010). Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Mol Aspects Med*, 31 (6): 435-445.
- Gackowski D., Kruszewski M., Jawien A., Ciecierski M. and Olinski R. (2001). Further evidence that oxidative stress may be a risk factor responsible for the development of atherosclerosis. *Free Radic Biol Med*, 31 (4): 542-547.
- Gamba P., Leonarduzzi G., Tamagno E., Guglielmotto M., Testa G., Sottero B., Gargiulo S., Biasi F., Mauro A., Vina J. and Poli G. (2011). Interaction between 24-hydroxycholesterol, oxidative stress, and amyloid-beta in amplifying neuronal damage in Alzheimer's disease: three partners in crime. *Aging Cell*, 10 (3): 403-417.
- Gamble P.E. and Burke J.J. (1984). Effect of water stress on the chloroplast antioxidant system: I. Alterations in glutathione reductase activity. *Plant Physiol*, 76 (3): 615-621.
- Gamet-Payraastre L., Manenti S., Gratacap M.P., Tulliez J., Chap H. and Payraastre B. (1999). Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-kinase. *Gen Pharmacol*, 32 (3): 279-286.
- Garcia-Cruset S., Carpenter K.L., Guardiola F. and Mitchinson M.J. (1999). Oxysterols in cap and core of human advanced atherosclerotic lesions. *Free Radic Res*, 30 (5): 341-350.
- Garcia-Ruiz C. and Fernandez-Checa J.C. (2006). Mitochondrial glutathione: hepatocellular survival-death switch. *J Gastroenterol Hepatol*, 21 Suppl 3 S3-6.
- Garg T.K. and Chang J.Y. (2003). Oxidative stress causes ERK phosphorylation and cell death in cultured retinal pigment epithelium: prevention of cell death by AG126 and 15-deoxy-delta 12, 14-PGJ2. *BMC Ophthalmol.*, 21: 3-5.
- Gazzetta Ufficiale - Serie Generale no. 272, 18-11-1992 Modificazione al disciplinare di produzione della denominazione di origine controllata dei vini "Cannonau di Sardegna".
- Ghyselinck N.B. and Dufaure J.P. (1990). A mouse cDNA sequence for epididymal androgen-regulated proteins related to glutathione peroxidase. *Nucleic Acids Res*, 18 (23): 7144.
- Gianni D., Bohl B., Courtneidge S.A. and Bokoch G.M. (2008). The involvement of the tyrosine kinase c-Src in the regulation of reactive oxygen species generation mediated by NADPH oxidase-1. *Mol Biol Cell*, 19 (7): 2984-2994.
- Gilbert H.F. (1990). Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 63: 69-172.
- Giovannini C., Filesi C., D'Archivio M., Scazzocchio B., Santangelo C. and Masella R. (2006). [Polyphenols and endogenous antioxidant defences: effects on glutathione and glutathione related enzymes]. *Ann Ist Super Sanità*, 42 (3): 336-347.

- Girao H., Mota M.C., Ramalho J. and Pereira P. (1998). Cholesterol oxides accumulate in human cataracts. *Exp Eye Res*, 66 (5): 645-652.
- Go Y.M. and Jones D.P. (2008). Redox compartmentalization in eukaryotic cells. *Biochim Biophys Acta*, 1780 (11): 1273-1290.
- Godoy J.R., Funke M., Ackermann W., Haunhorst P., Oesteritz S., Capani F., Elsasser H.P. and Lillig C.H. (2011). Redox atlas of the mouse. Immunohistochemical detection of glutaredoxin-, peroxiredoxin-, and thioredoxin-family proteins in various tissues of the laboratory mouse. *Biochim Biophys Acta*, 1810 (1): 2-92.
- Gordiyenko N., Campos M., Lee J.W., Fariss R.N., Sztein J. and Rodriguez I.R. (2004). RPE cells internalize low-density lipoprotein (LDL) and oxidized LDL (oxLDL) in large quantities in vitro and in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45 (8): 2822-2829.
- Gotoh Y., Noda T., Iwakiri R., Fujimoto K., Rhoads C.A. and Aw T.Y. (2002). Lipid peroxide-induced redox imbalance differentially mediates CaCo-2 cell proliferation and growth arrest. *Cell Prolif*, 35 (4): 221-235.
- Grandvaux N., Soucy-Faulkner A. and Fink K. (2007). Innate host defense: Nox and Duox on phox's tail. *Biochimie*, 89 (9): 1113-1122.
- Green R.M., Graham M., O'Donovan M.R., Chipman J.K. and Hodges N.J. (2006). Subcellular compartmentalization of glutathione: correlations with parameters of oxidative stress related to genotoxicity. *Mutagenesis*, 21 (6): 383-390.
- Greene E.L., Velarde V. and Jaffa A.A. (2000). Role of reactive oxygen species in bradykinin-induced mitogen-activated protein kinase and c-fos induction in vascular cells. *Hypertension*, 35 (4): 942-947.
- Gu Y., Xu Y., Law B. and Qian S.Y. (2013). The first characterization of free radicals formed from cellular COX-catalyzed peroxidation. *Free Radic Biol Med*, 57: 49-60.
- Guardiola F., Codony R., Addis P.B., Rafecas M. and Boatella J. (1996). Biological effects of oxysterols: current status. *Food Chem Toxicol*, 34 (2): 193-211.
- Guardiola F., Dutta P.C., Codony R. and Savage G.P. (2002). Cholesterol and phytosterol oxydation products: analysis, occurrence, and biological effects. Champaign: AOCS Press.
- Hagen T.M., Aw T.Y. and Jones D.P. (1988). Glutathione uptake and protection against oxidative injury in isolated kidney cells. *Kidney Int*, 34 (1): 74-81.
- Hagen T.M. and Jones D.P. (1987). Transepithelial transport of glutathione in vascularly perfused small intestine of rat. *Am J Physiol*, 252 (5 Pt 1): G607-613.
- Hagen T.M., Wierzbicka G.T., Bowman B.B., Aw T.Y. and Jones D.P. (1990). Fate of dietary glutathione: disposition in the gastrointestinal tract. *Am J Physiol*, 259 (4 Pt 1): G530-535.
- Halliwell B. (1990). How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic Res Commun*, 9 (1): 1-32.
- Halliwell B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans*, 35 (Pt 5): 1147-1150.
- Halliwell B. and Gutteridge J.M. (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic Biol Med*, 18 (1): 125-126.

- Halpner A.D., Handelman G.J., Belmont C.A., Harris J.M. and Blumberg J.B. (1998). Protection by vitamin C of oxidant-induced loss of vitamin E in rat hepatocytes. *J. Nutr. Biochem.*, 9: 355-359.
- Han J.H., Kim Y.J., Han E.S. and Lee C.S. (2007). Prevention of 7-ketocholesterol-induced mitochondrial damage and cell death by calmodulin inhibition. *Brain Res*, 1137 (1): 11-19.
- Hansen J.M., Go Y.M. and Jones D.P. (2006). Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 46: 215-234.
- Haunhorst P., Berndt C., Eitner S., Godoy J.R. and Lillig C.H. (2010). Characterization of the human monothiol glutaredoxin 3 (PICOT) as iron-sulfur protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 394 (2): 372-376.
- He M., Openo K., McCullough M. and Jones D.P. (2004). Total equivalent of reactive chemicals in 142 human food items is highly variable within and between major food groups. *J Nutr*, 134 (5): 1114-1119.
- Heim K.E., Tagliaferro A.R. and Bobilya D.J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem*, 13 (10): 572-584.
- Herbette S., Roeckel-Drevet P. and Drevet J.R. (2007). Seleno-independent glutathione peroxidases. More than simple antioxidant scavengers. *FEBS J*, 274 (9): 2163-2180.
- Herrmann J.M. and Riemer J. (2010). The intermembrane space of mitochondria. *Antioxid Redox Signal*, 13 (9): 1341-1358.
- Hilenski L.L., Clempus R.E., Quinn M.T., Lambeth J.D. and Griendling K.K. (2004). Distinct subcellular localizations of Nox1 and Nox4 in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24 (4): 677-683.
- Hipler U.C., Wollina U., Denning D. and Hipler B. (2002). Fluorescence Analysis of Reactive Oxygen Species (ROS) Generated by Six Isolates of *Aspergillus Fumigatus*. *BMG Labtechnologies*, 49.
- Ho Y.F. and Guenther T.M. (1997). Isolation of liver nuclei that retain functional trans-membrane transport. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 38 (3): 163-168.
- Hodis H.N., Chauhan A., Hashimoto S., Crawford D.W. and Sevanian A. (1992). Probucol reduces plasma and aortic wall oxysterol levels in cholesterol fed rabbits independently of its plasma cholesterol lowering effect. *Atherosclerosis*, 96 (2-3): 125-134.
- Hoensch H., Peters W.H., Roelofs H.M. and Kirch W. (2006). Expression of the glutathione enzyme system of human colon mucosa by localisation, gender and age. *Curr Med Res Opin*, 22 (6): 1075-1083.
- Hoffenberg E.J., Deutsch J., Smith S. and Sokol R.J. (1997). Circulating antioxidant concentrations in children with inflammatory bowel disease. *Am J Clin Nutr*, 65 (5): 1482-1488.
- Hollecker L., Pinna M., Filippino G., Scrugli S., Pinna B., Argiolas F. and Murru M. (2009). Simultaneous determination of polyphenolic compounds in red and white grapes grown in Sardinia by high performance liquid chromatography-electron spray ionisation-mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1216 (15): 3402-3408.

- Holmes E.W., Yong S.L., Eiznhamer D. and Keshavarzian A. (1998). Glutathione content of colonic mucosa: evidence for oxidative damage in active ulcerative colitis. *Dig Dis Sci*, 43 (5): 1088-1095.
- Huang R.F., Yaong H.C., Chen S.C. and Lu Y.F. (2004). In vitro folate supplementation alleviates oxidative stress, mitochondria-associated death signalling and apoptosis induced by 7-ketocholesterol. *Br J Nutr*, 92 (6): 887-894.
- Hudson V.M. (2004). New insights into the pathogenesis of cystic fibrosis: pivotal role of glutathione system dysfunction and implications for therapy. *Treat Respir Med*, 3 (6): 353-363.
- Hur S.J., Park G.B. and Joo S.T. (2007). Formation of cholesterol oxidation products (COPs) in animal products. *Food Control*, 18: 939-947.
- Hussain T., Gupta S., Adhami V.M. and Mukhtar H. (2005). Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate selectively inhibits COX-2 without affecting COX-1 expression in human prostate carcinoma cells. *Int J Cancer*, 113 (4): 660-669.
- Huwait E.A., Greenow K.R., Singh N.N. and Ramji D.P. (2011). A novel role for c-Jun N-terminal kinase and phosphoinositide 3-kinase in the liver X receptor-mediated induction of macrophage gene expression. *Cell Signal*, 23 (3): 542-549.
- Iantomasi T., Marraccini P., Favilli F., Vincenzini M.T., Ferretti P. and Tonelli F. (1994). Glutathione metabolism in Crohn's disease. *Biochem Med Metab Biol*, 53 (2): 87-91.
- Isemura M., Saeki K., Minami T., Hayakawa S., Kimura T., Shoji Y. and Sazuka M. (1999). Inhibition of matrix metalloproteinases by tea catechins and related polyphenols. *Ann N Y Acad Sci*, 878: 629-631.
- Iwakiri R., Gotoh Y., Noda T., Sugihara H., Fujimoto K., Fuseler J. and Aw T.Y. (2001). Programmed cell death in rat intestine: effect of feeding and fasting. *Scand J Gastroenterol*, 36 (1): 39-47.
- Jee J.P., Lim S.J., Park J.S. and Kim C.K. (2006). Stabilization of all-trans retinol by loading lipophilic antioxidants in solid lipid nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm*, 63 (2): 134-139.
- Jeon S.E., Choi-Kwon S., Park K.A., Lee H.J., Park M.S., Lee J.H., Kwon S.B. and Park K.C. (2003). Dietary supplementation of (+)-catechin protects against UVB-induced skin damage by modulating antioxidant enzyme activities. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 19 (5): 235-241.
- Jiang Y., Chen C., Li Z., Guo W., Gegner J.A., Lin S. and Han J. (1996). Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). *J Biol Chem*, 271 (30): 17920-17926.
- Joffre C., Leclere L., Buteau B., Martine L., Cabaret S., Malvitte L., Acar N., Lizard G., Bron A., Creuzot-Garcher C. and Bretillon L. (2007). Oxysterols induced inflammation and oxidation in primary porcine retinal pigment epithelial cells. *Curr Eye Res*, 32 (3): 271-280.
- Jonas C.R., Ziegler T.R., Gu L.H. and Jones D.P. (2002). Extracellular thiol/disulfide redox state affects proliferation rate in a human colon carcinoma (Caco2) cell line. *Free Radic Biol Med*, 33 (11): 1499-1506.
- Jones D.P. (2002). Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. *Methods Enzymol*, 348: 93-112.
- Jones D.P. (2006). Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*, 8 (9-10): 1865-1879.

- Jones D.P., Coates R.J., Flagg E.W., Eley J.W., Block G., Greenberg R.S., Gunter E.W. and Jackson B. (1992). Glutathione in foods listed in the National Cancer Institute's Health Habits and History Food Frequency Questionnaire. *Nutr Cancer*, 17 (1): 57-75.
- Jones D.P. and Go Y.M. (2010). Redox compartmentalization and cellular stress. *Diabetes Obes Metab*, 12 (Suppl 2): 116-125.
- Jusakul A., Yongvanit P., Loilome W., Namwat N. and Kuver R. (2011). Mechanisms of oxysterol-induced carcinogenesis. *Lipids Health Dis*, 10: 44.
- Kabe Y., Ando K., Hirao S., Yoshida M. and Handa H. (2005). Redox regulation of NF-kappaB activation: distinct redox regulation between the cytoplasm and the nucleus. *Antioxid Redox Signal*, 7 (3-4): 395-403.
- Kamga C.K., Zhang S.X. and Wang Y. (2010). Dicarboxylate carrier-mediated glutathione transport is essential for reactive oxygen species homeostasis and normal respiration in rat brain mitochondria. *Am J Physiol Cell Physiol*, 299 (2): C497-505.
- Kancheva V.D. (2009). Phenolic antioxidants - radical-scavenging and chain-breaking activity: a comparative study *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 111: 1072-1089.
- Kand'ar R., Zakova P. and Muzakova V. (2006). Monitoring of antioxidant properties of uric acid in humans for a consideration measuring of levels of allantoin in plasma by liquid chromatography. *Clin Chim Acta*, 365 (1-2): 249-256.
- Kandutsch A.A. and Chen H.W. (1974). Inhibition of sterol synthesis in cultured mouse cells by cholesterol derivatives oxygenated in the side chain. *J Biol Chem*, 249 (19): 6057-6061.
- Kanner J. (2007). Dietary advanced lipid oxidation endproducts are risk factors to human health. *Mol Nutr Food Res*, 51 (9): 1094-1101.
- Karin M. (2006). Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature*, 441 (7092): 431-436.
- Katsuyama M. (2010). NOX/NADPH oxidase, the superoxide-generating enzyme: its transcriptional regulation and physiological roles. *J Pharmacol Sci*, 114 (2): 134-146.
- Katsuyama M., Fan C. and Yabe-Nishimura C. (2002). NADPH oxidase is involved in prostaglandin F2alpha-induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells: induction of NOX1 by PGF2alpha. *J Biol Chem*, 277 (16): 13438-13442.
- Kawahara T., Kuwano Y., Teshima-Kondo S., Takeya R., Sumimoto H., Kishi K., Tsunawaki S., Hirayama T. and Rokutan K. (2004). Role of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 1 in oxidative burst response to Toll-like receptor 5 signaling in large intestinal epithelial cells. *J Immunol*, 172 (5): 3051-3058.
- Keaney J.F., Jr., Larson M.G., Vasan R.S., Wilson P.W., Lipinska I., Corey D., Massaro J.M., Sutherland P., Vita J.A. and Benjamin E.J. (2003). Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23 (3): 434-439.
- Kemp M., Go Y.M. and Jones D.P. (2008). Nonequilibrium thermodynamics of thiol/disulfide redox systems: a perspective on redox systems biology. *Free Radic Biol Med*, 44 (6): 921-937.

- Khan N. and Sultana S. (2004). Abrogation of potassium bromate-induced renal oxidative stress and subsequent cell proliferation response by soy isoflavones in Wistar rats. *Toxicology*, 201 (1-3): 173-184.
- Khan S.A. and Vanden Heuvel J.P. (2003). Role of nuclear receptors in the regulation of gene expression by dietary fatty acids (review). *J Nutr Biochem*, 14 (10): 554-567.
- Khlebnikov A.I., Schepetkin I.A., Domina N.G., Kirpotina L.N. and Quinn M.T. (2007). Improved quantitative structure-activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. *Bioorg Med Chem*, 15 (4): 1749-1770.
- Kim C., Sano Y., Todorova K., Carlson B.A., Arpa L., Celada A., Lawrence T., Otsu K., Brissette J.L., Arthur J.S. and Park J.M. (2008). The kinase p38 alpha serves cell type-specific inflammatory functions in skin injury and coordinates pro- and anti-inflammatory gene expression. *Nat Immunol*, 9 (9): 1019-1027.
- Kim G.Y., Lee J.W., Ryu H.C., Wei J.D., Seong C.M. and Kim J.H. (2010). Proinflammatory cytokine IL-1beta stimulates IL-8 synthesis in mast cells via a leukotriene B4 receptor 2-linked pathway, contributing to angiogenesis. *J Immunol*, 184 (7): 3946-3954.
- Kipp A., Banning A. and Brigelius-Flohé R. (2007). Activation of the glutathione peroxidase 2 (GPx2) promoter by beta-catenin. *Biol Chem*, 388 (10): 1027-1033.
- Kipp A.P., Muller M.F., Goken E.M., Deubel S. and Brigelius-Flohé R. (2012). The selenoproteins GPx2, TrxR2 and TrxR3 are regulated by Wnt signalling in the intestinal epithelium. *Biochim Biophys Acta*, 1820 (10): 1588-1596.
- Knoll N., Ruhe C., Veeriah S., Sauer J., Glei M., Gallagher E.P. and Pool-Zobel B.L. (2005). Genotoxicity of 4-hydroxy-2-nonenal in human colon tumor cells is associated with cellular levels of glutathione and the modulation of glutathione S-transferase A4 expression by butyrate. *Toxicol Sci*, 86 (1): 27-35.
- Koehler C.M., Beverly K.N. and Leverich E.P. (2006). Redox pathways of the mitochondrion. *Antioxid Redox Signal*, 8 (5-6): 813-822.
- Kohrle J. (2005). Selenium and the control of thyroid hormone metabolism. *Thyroid*, 15 (8): 841-853.
- Kong A.N., Yu R., Chen C., Mandlekar S. and Primiano T. (2000). Signal transduction events elicited by natural products: role of MAPK and caspase pathways in homeostatic response and induction of apoptosis. *Arch Pharm Res*, 23 (1): 1-16.
- Kopitz J., Holz F.G., Kaemmerer E. and Schutt F. (2004). Lipids and lipid peroxidation products in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Biochimie*, 86 (11): 825-831.
- Krimmel B., Swoboda F., Solar S. and Reznicek G. (2010). OH-radical induced degradation of hydroxybenzoic- and hydroxycinnamic acids and formation of aromatic products - a gamma radiolysis study *Radiat. Phys.Chem.*, 79: 1247-1254.
- Krinsky N.I. and Johnson E.J. (2005). Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Mol Aspects Med*, 26 (6): 459-516.
- Kroon P.A. (1997). Cholesterol and atherosclerosis. *Aust N Z J Med*, 27 (4): 492-496.
- Krut L.H., Yang J.W., Schonfeld G. and Ostlund R.E., Jr. (1997). The effect of oxidizing cholesterol on gastrointestinal absorption, plasma clearance, tissue distribution, and processing by endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17 (4): 778-785.

- Kryukov G.V., Castellano S., Novoselov S.V., Lobanov A.V., Zehtab O., Guigo R. and Gladyshev V.N. (2003). Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science*, 300 (5624): 1439-1443.
- Kuhnau J. (1976). The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet*, 24: 117-191.
- Kuntz S., Kunz C. and Rudloff S. (2010). Carbonyl compounds methylglyoxal and glyoxal affect interleukin-8 secretion in intestinal cells by superoxide anion generation and activation of MAPK p38. *Mol Nutr Food Res*, 54 (10): 1458-1467.
- Kuwano Y., Tominaga K., Kawahara T., Sasaki H., Takeo K., Nishida K., Masuda K., Kawai T., Teshima-Kondo S. and Rokutan K. (2008). Tumor necrosis factor alpha activates transcription of the NADPH oxidase organizer 1 (NOXO1) gene and upregulates superoxide production in colon epithelial cells. *Free Radic Biol Med*, 45 (12): 1642-1652.
- Kwon Y.W., Masutani H., Nakamura H., Ishii Y. and Yodoi J. (2003). Redox regulation of cell growth and cell death. *Biol Chem*, 384 (7): 991-996.
- Kyriakis J.M. and Avruch J. (2012). Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. *Physiol Rev*, 92 (2): 689-737.
- Lanati D. (2004). Come si fa il vino. In *Il libro del vino - Manuale teorico & pratico*. Mantovano L.E. Ed. G.R.H. S.p.A., Roma: 27-60.
- Lash L.H. and Jones D.P. (1984). Characteristics of cysteine uptake in intestinal basolateral membrane vesicles. *Am J Physiol*, 247 (4 Pt 1): G394-401.
- Lassegue B., Sorescu D., Szocs K., Yin Q., Akers M., Zhang Y., Grant S.L., Lambeth J.D. and Griendling K.K. (2001). Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells : nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ Res*, 88 (9): 888-894.
- Laughton M.J., Evans P.J., Moroney M.A., Houlst J.R. and Halliwell B. (1991). Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability. *Biochem Pharmacol*, 42 (9): 1673-1681.
- Le Ferrec E., Chesne C., Artusson P., Brayden D., Fabre G., Gires P., Guillou F., Rousset M., Rubas W. and Scarino M.L. (2001). In vitro models of the intestinal barrier. The report and recommendations of ECVAM Workshop 46. European Centre for the Validation of Alternative methods. *Altern Lab Anim*, 29 (6): 649-668.
- Lee S.H., Park D.W., Park S.C., Park Y.K., Hong S.Y., Kim J.R., Lee C.H. and Baek S.H. (2009). Calcium-independent phospholipase A2beta-Akt signaling is involved in lipopolysaccharide-induced NADPH oxidase 1 expression and foam cell formation. *J Immunol*, 183 (11): 7497-7504.
- Lee T. and Chau L. (2001). Fas/Fas ligand-mediated death pathway is involved in oxLDL-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 280 (3): C709-718.
- Lee W.H., Lee C.S., Kwon K., Kwon Y.S., Kim S.W., Goo T.W. and Kwon O.Y. (2009). 7-ketocholesterol induces endoplasmic reticulum stress in HT-29 cells. *Z Naturforsch C*, 64 (3-4): 307-310.

- Lee Y.S., Kim A.Y., Choi J.W., Kim M., Yasue S., Son H.J., Masuzaki H., Park K.S. and Kim J.B. (2008). Dysregulation of adipose glutathione peroxidase 3 in obesity contributes to local and systemic oxidative stress. *Mol Endocrinol*, 22 (9): 2176-2189.
- Lemaire-Ewing S., Berthier A., Royer M.C., Logette E., Corcos L., Bouchot A., Monier S., Prunet C., Raveneau M., Rebe C., Desrumaux C., Lizard G. and Neel D. (2009). 7beta-Hydroxycholesterol and 25-hydroxycholesterol-induced interleukin-8 secretion involves a calcium-dependent activation of c-fos via the ERK1/2 signaling pathway in THP-1 cells: oxysterols-induced IL-8 secretion is calcium-dependent. *Cell Biol Toxicol*, 25 (2): 127-139.
- Lemaire-Ewing S., Prunet C., Montange T., Vejux A., Berthier A., Bessede G., Corcos L., Gambert P., Neel D. and Lizard G. (2005). Comparison of the cytotoxic, pro-oxidant and pro-inflammatory characteristics of different oxysterols. *Cell Biol Toxicol*, 21 (2): 97-114.
- Lemaire S., Lizard G., Monier S., Miguet C., Gueldry S., Volot F., Gambert P. and Neel D. (1998). Different patterns of IL-1beta secretion, adhesion molecule expression and apoptosis induction in human endothelial cells treated with 7alpha-, 7beta-hydroxycholesterol, or 7-ketocholesterol. *FEBS Lett*, 440 (3): 434-439.
- Lenormand P., Sardet C., Pages G., L'Allemain G., Brunet A. and Pouyssegur J. (1993). Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk and p44mapk) but not of their activator MAP kinase kinase (p45mapkk) in fibroblasts. *J Cell Biol*, 122 (5): 1079-1088.
- Leonarduzzi G., Gamba P., Gargiulo S., Sottero B., Kadl A., Biasi F., Chiarpotto E., Leitinger N., Vendemiale G., Serviddio G. and Poli G. (2008). Oxidation as a crucial reaction for cholesterol to induce tissue degeneration: CD36 overexpression in human promonocytic cells treated with a biologically relevant oxysterol mixture. *Aging Cell*, 7 (3): 375-382.
- Leonarduzzi G., Gamba P., Sottero B., Kadl A., Robbesyn F., Calogero R.A., Biasi F., Chiarpotto E., Leitinger N., Sevanian A. and Poli G. (2005). Oxysterol-induced up-regulation of MCP-1 expression and synthesis in macrophage cells. *Free Radic Biol Med*, 39 (9): 1152-1161.
- Leonarduzzi G., Sevanian A., Sottero B., Arkan M.C., Biasi F., Chiarpotto E., Basaga H. and Poli G. (2001). Up-regulation of the fibrogenic cytokine TGF-beta1 by oxysterols: a mechanistic link between cholesterol and atherosclerosis. *FASEB J*, 15 (9): 1619-1621.
- Leonarduzzi G., Sottero B. and Poli G. (2002). Oxidized products of cholesterol: dietary and metabolic origin, and proatherosclerotic effects (review). *J Nutr Biochem*, 13 (12): 700-710.
- Leonarduzzi G., Sottero B. and Poli G. (2010). Targeting tissue oxidative damage by means of cell signaling modulators: the antioxidant concept revisited. *Pharmacol Ther*, 128 (2): 336-374.
- Leonarduzzi G., Vizio B., Sottero B., Verde V., Gamba P., Mascia C., Chiarpotto E., Poli G. and Biasi F. (2006). Early involvement of ROS overproduction in apoptosis induced by 7-ketocholesterol. *Antioxid Redox Signal*, 8 (3-4): 375-380.
- Liao P.L., Cheng Y.W., Li C.H., Lo Y.L. and Kang J.J. (2009). Cholesterol-3-beta, 5-alpha, 6-beta-triol induced PI(3)K-Akt-eNOS-dependent cyclooxygenase-2 expression in endothelial cells. *Toxicol Lett*, 190 (2): 172-178.
- Lim K.H., Riddell L.J., Nowson C.A., Booth A.O. and Szymlek-Gay E.A. (2013). Iron and zinc nutrition in the economically-developed world: a review. *Nutrients*, 5 (8): 3184-3211.

- Liu H., Yuan L., Xu S., Wang K. and Zhang T. (2005). Cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol inhibits osteoblastic differentiation and promotes apoptosis of rat bone marrow stromal cells. *J Cell Biochem*, 96 (1): 198-208.
- Liu H., Zhang C. and Huang K. (2011). Lanthanum chloride suppresses oxysterol-induced ECV-304 cell apoptosis via inhibition of intracellular Ca(2+) concentration elevation, oxidative stress, and activation of ERK and NF- κ B signaling pathways. *J Biol Inorg Chem*, 16 (5): 671-681.
- Liu Y., Hulten L.M. and Wiklund O. (1997). Macrophages isolated from human atherosclerotic plaques produce IL-8, and oxysterols may have a regulatory function for IL-8 production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17 (2): 317-323.
- Lizard G., Gueldry S., Sordet O., Monier S., Athias A., Miguët C., Bessède G., Lemaire S., Solary E. and Gambert P. (1998). Glutathione is implied in the control of 7-ketocholesterol-induced apoptosis, which is associated with radical oxygen species production. *FASEB J*, 12 (15): 1651-1663.
- Lizard G., Lemaire S., Monier S., Gueldry S., Neel D. and Gambert P. (1997). Induction of apoptosis and of interleukin-1 β secretion by 7 β -hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol: partial inhibition by Bcl-2 overexpression. *FEBS Lett*, 419 (2-3): 276-280.
- Lizard G., Miguët C., Bessède G., Monier S., Gueldry S., Neel D. and Gambert P. (2000). Impairment with various antioxidants of the loss of mitochondrial transmembrane potential and of the cytosolic release of cytochrome c occurring during 7-ketocholesterol-induced apoptosis. *Free Radic Biol Med*, 28 (5): 743-753.
- Lobo V., Patil A., Phatak A. and Chandra N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*, 4 (8): 118-126.
- Lordan S., O'Neill C. and O'Brien N.M. (2008). Effects of apigenin, lycopene and astaxanthin on 7 β -hydroxycholesterol-induced apoptosis and Akt phosphorylation in U937 cells. *Br J Nutr*, 100 (2): 287-296.
- Loru D., Deiana M., Incani A., Atzeri A., Melis M.P., Rosa A., Cabboi B., Hollecker L. and Dessì M.A. (2012). A selection of grapes from Sardinia: antioxidant properties. *Progr. Nutr.*, 14 (4): 257-264.
- Loru D., Deiana M., Incani A., Atzeri A., Rosa A., Melis M.P., Cabboi B., Hollecker L. and Dessì M.A. (2011). Antioxidant properties of the phenolic fraction of Sardinian wines. *J. Biol. Res*, 84 (1).
- Lu J.M., Lin P.H., Yao Q. and Chen C. (2010). Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *J Cell Mol Med*, 14 (4): 840-860.
- Lutjohann D., Breuer O., Ahlborg G., Nennesmo I., Siden A., Diczfalusy U. and Bjorkhem I. (1996). Cholesterol homeostasis in human brain: evidence for an age-dependent flux of 24S-hydroxycholesterol from the brain into the circulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 (18): 9799-9804.
- Luximon-Ramma A., Bahorun T., Soobrattee M.A. and Aruoma O.I. (2002). Antioxidant activities of phenolic, proanthocyanidin, and flavonoid components in extracts of *Cassia fistula*. *J Agric Food Chem*, 50 (18): 5042-5047.
- Lyons M.A. and Brown A.J. (1999). 7-Ketocholesterol. *Int J Biochem Cell Biol*, 31 (3-4): 369-375.

- Lyons N.M., Woods J.A. and O'Brien N.M. (2001). alpha-Tocopherol, but not gamma-tocopherol inhibits 7 beta-hydroxycholesterol-induced apoptosis in human U937 cells. *Free Radic Res*, 35 (3): 329-339.
- Maeda K., Okubo K., Shimomura I., Mizuno K., Matsuzawa Y. and Matsubara K. (1997). Analysis of an expression profile of genes in the human adipose tissue. *Gene*, 190 (2): 227-235.
- Malinouski M., Kehr S., Finney L., Vogt S., Carlson B.A., Seravalli J., Jin R., Handy D.E., Park T.J., Loscalzo J., Hatfield D.L. and Gladyshev V.N. (2012). High-resolution imaging of selenium in kidneys: a localized selenium pool associated with glutathione peroxidase 3. *Antioxid Redox Signal*, 16 (3): 185-192.
- Malvitte L., Montange T., Joffre C., Vejux A., Maiza C., Bron A., Creuzot-Garcher C. and Lizard G. (2006). [Analogies between atherosclerosis and age-related maculopathy: expected roles of oxysterols]. *J Fr Ophtalmol*, 29 (5): 570-578.
- Mandal D., Fu P. and Levine A.D. (2010). REDOX regulation of IL-13 signaling in intestinal epithelial cells: usage of alternate pathways mediates distinct gene expression patterns. *Cell Signal*, 22 (10): 1485-1494.
- Mannery Y.O., Ziegler T.R., Hao L., Shyntum Y. and Jones D.P. (2010). Characterization of apical and basal thiol-disulfide redox regulation in human colonic epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 299 (2): G523-530.
- Margis R., Dunand C., Teixeira F.K. and Margis-Pinheiro M. (2008). Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview. *FEBS J*, 275 (15): 3959-3970.
- Marinho H.S., Antunes F. and Pinto R.E. (1997). Role of glutathione peroxidase and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the reduction of lysophospholipid hydroperoxides. *Free Radic Biol Med*, 22 (5): 871-883.
- Mariotti M., Ridge P.G., Zhang Y., Lobanov A.V., Pringle T.H., Guigo R., Hatfield D.L. and Gladyshev V.N. (2012). Composition and evolution of the vertebrate and mammalian selenoproteomes. *PLoS One*, 7 (3): e33066.
- Markovic J., Borrás C., Ortega A., Sastre J., Vina J. and Pallardo F.V. (2007). Glutathione is recruited into the nucleus in early phases of cell proliferation. *J Biol Chem*, 282 (28): 20416-20424.
- Martin M.A., Serrano A.B., Ramos S., Pulido M.I., Bravo L. and Goya L. (2010). Cocoa flavonoids up-regulate antioxidant enzyme activity via the ERK1/2 pathway to protect against oxidative stress-induced apoptosis in HepG2 cells. *J Nutr Biochem*, 21 (3): 196-205.
- Mascia C., Maina M., Chiarpotto E., Leonarduzzi G., Poli G. and Biasi F. (2010). Proinflammatory effect of cholesterol and its oxidation products on CaCo-2 human enterocyte-like cells: effective protection by epigallocatechin-3-gallate. *Free Radic Biol Med*, 49 (12): 2049-2057.
- McIlwain C.C., Townsend D.M. and Tew K.D. (2006). Glutathione S-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy. *Oncogene*, 25 (11): 1639-1648.
- Meister A. and Anderson M.E. (1983). Glutathione. *Annu Rev Biochem*, 52: 711-760.
- Meloche S. and Pouyssegur J. (2007). The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene*, 26 (22): 3227-3239.

- Meunier V., Bourrie M., Berger Y. and Fabre G. (1995). The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications. *Cell Biol Toxicol*, 11 (3-4): 187-194.
- Miguet-Alfonsi C., Prunet C., Monier S., Bessedé G., Lemaire-Ewing S., Berthier A., Menetrier F., Neel D., Gambert P. and Lizard G. (2002). Analysis of oxidative processes and of myelin figures formation before and after the loss of mitochondrial transmembrane potential during 7 β -hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol-induced apoptosis: comparison with various pro-apoptotic chemicals. *Biochem Pharmacol*, 64 (3): 527-541.
- Miller F.J., Jr., Filali M., Huss G.J., Stanic B., Chamseddine A., Barna T.J. and Lamb F.S. (2007). Cytokine activation of nuclear factor kappa B in vascular smooth muscle cells requires signaling endosomes containing Nox1 and CIC-3. *Circ Res*, 101 (7): 663-671.
- Min D.B. and Boff J.M. (2002). Chemistry and reaction of singlet oxygen in foods. *Comp. Rev. Food Sci. F.*, 1: 58-72.
- Mistry N., Bevan R.J., Cooke M.S., Evans M.D., Halligan E.P., Lowes D.A., Nichol K. and Lunec J. (2008). Antiserum detection of reactive carbonyl species-modified DNA in human colonocytes. *Free Radic Res*, 42 (4): 344-353.
- Mizukami Y., Yoshioka K., Morimoto S. and Yoshida K. (1997). A novel mechanism of JNK1 activation. Nuclear translocation and activation of JNK1 during ischemia and reperfusion. *J Biol Chem*, 272 (26): 16657-16662.
- Molina M.F., Sanchez-Reus I., Iglesias I. and Benedi J. (2003). Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects against ethanol-induced oxidative stress in mouse liver. *Biol Pharm Bull*, 26 (10): 1398-1402.
- Monasterio A., Urdaci M.C., Pinchuk I.V., Lopez-Moratalla N. and Martinez-Irujo J.J. (2004). Flavonoids induce apoptosis in human leukemia U937 cells through caspase- and caspase-calpain-dependent pathways. *Nutr Cancer*, 50 (1): 90-100.
- Moriarty-Craige S.E. and Jones D.P. (2004). Extracellular thiols and thiol/disulfide redox in metabolism. *Annu Rev Nutr*, 24: 481-509.
- Moskaug J.O., Carlsen H., Myhrstad M.C. and Blomhoff R. (2005). Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *Am J Clin Nutr*, 81 (1 Suppl): 277S-283S.
- Mueller S.O., Simon S., Chae K., Metzler M. and Korach K.S. (2004). Phytoestrogens and their human metabolites show distinct agonistic and antagonistic properties on estrogen receptor alpha (ERalpha) and ERbeta in human cells. *Toxicol Sci*, 80 (1): 14-25.
- Murphy K.J., Chronopoulos A.K., Singh I., Francis M.A., Moriarty H., Pike M.J., Turner A.H., Mann N.J. and Sinclair A.J. (2003). Dietary flavanols and procyanidin oligomers from cocoa (*Theobroma cacao*) inhibit platelet function. *Am J Clin Nutr*, 77 (6): 1466-1473.
- Naasani I., Oh-Hashi F., Oh-Hara T., Feng W.Y., Johnston J., Chan K. and Tsuruo T. (2003). Blocking telomerase by dietary polyphenols is a major mechanism for limiting the growth of human cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res*, 63 (4): 824-830.
- Naito Y., Shimozawa M., Manabe H., Kuroda M., Tomatsuri N., Uchiyama K., Takagi T., Yoshida N. and Yoshikawa T. (2004). Inhibitory effects of red wine extracts on endothelial-dependent adhesive interactions with monocytes induced by oxysterols. *Biol Res*, 37 (2): 231-238.

- Nardini M., Forte M., Vrhovsek U., Mattivi F., Viola R. and Scaccini C. (2009). White wine phenolics are absorbed and extensively metabolized in humans. *J Agric Food Chem*, 57 (7): 2711-2718.
- Natarajan S.K. and Becker D.F. (2012). Role of apoptosis-inducing factor, proline dehydrogenase, and NADPH oxidase in apoptosis and oxidative stress. *Cell Health Cytoskeleton*, 2012 (4): 11-27.
- Ndiaye M., Chataigneau T., Chataigneau M. and Schini-Kerth V.B. (2004). Red wine polyphenols induce EDHF-mediated relaxations in porcine coronary arteries through the redox-sensitive activation of the PI3-kinase/Akt pathway. *Br J Pharmacol*, 142 (7): 1131-1136.
- Neil M.W. (1959). The absorption of cystine and cysteine from rat small intestine. *Biochem J*, 71 (1): 118-124.
- Nguyen V.D., Saaranen M.J., Karala A.R., Lappi A.K., Wang L., Raykhel I.B., Alanen H.I., Salo K.E., Wang C.C. and Ruddock L.W. (2010). Two endoplasmic reticulum PDI peroxidases increase the efficiency of the use of peroxide during disulfide bond formation *J. Mol. Biol*, 406: 503-515.
- Nkabyo Y.S., Ziegler T.R., Gu L.H., Watson W.H. and Jones D.P. (2002). Glutathione and thioredoxin redox during differentiation in human colon epithelial (Caco-2) cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 283 (6): G1352-1359.
- Noda T., Iwakiri R., Fujimoto K. and Aw T.Y. (2001). Induction of mild intracellular redox imbalance inhibits proliferation of CaCo-2 cells. *FASEB J*, 15 (12): 2131-2139.
- Norlin M., Toll A., Bjorkhem I. and Wikvall K. (2000). 24-hydroxycholesterol is a substrate for hepatic cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A). *J Lipid Res*, 41 (10): 1629-1639.
- Noshita N., Sugawara T., Hayashi T., Lewen A., Omar G. and Chan P.H. (2002). Copper/zinc superoxide dismutase attenuates neuronal cell death by preventing extracellular signal-regulated kinase activation after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Neurosci*, 22 (18): 7923-7930.
- O'Callaghan Y.C., Woods J.A. and O'Brien N.M. (2001). Comparative study of the cytotoxicity and apoptosis-inducing potential of commonly occurring oxysterols. *Cell Biol Toxicol*, 17 (2): 127-137.
- O'Callaghan Y.C., Woods J.A. and O'Brien N.M. (2002). Characteristics of 7 beta-hydroxycholesterol-induced cell death in a human monocytic blood cell line, U937, and a human hepatoma cell line, HepG2. *Toxicol In Vitro*, 16 (3): 245-251.
- O'Leary K.A., de Pascual-Teresa S., Needs P.W., Bao Y.P., O'Brien N.M. and Williamson G. (2004). Effect of flavonoids and vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription. *Mutat Res*, 551 (1-2): 245-254.
- O'Sullivan A J., O'Callaghan Y C. and O'Brien N M. (2005). Differential effects of mixtures of cholesterol oxidation products on bovine aortic endothelial cells and human monocytic U937 cells. *Int J Toxicol*, 24 (3): 173-179.
- O'Sullivan A.J., O'Callaghan Y.C., Woods J.A. and O'Brien N.M. (2003). Toxicity of cholesterol oxidation products to Caco-2 and HepG2 cells: modulatory effects of α - and γ -tocopherol. *J Appl Toxicol*, 23 (3): 191-197.
- Oak M.H., El Bedoui J., Anglard P. and Schini-Kerth V.B. (2004). Red wine polyphenolic compounds strongly inhibit pro-matrix metalloproteinase-2 expression and its activation in response to

- thrombin via direct inhibition of membrane type 1-matrix metalloproteinase in vascular smooth muscle cells. *Circulation*, 110 (13): 1861-1867.
- Olkkonen V.M. and Lehto M. (2004). Oxysterols and oxysterol binding proteins: role in lipid metabolism and atherosclerosis. *Ann Med*, 36 (8): 562-572.
- Olson G.E., Whitin J.C., Hill K.E., Winfrey V.P., Motley A.K., Austin L.M., Deal J., Cohen H.J. and Burk R.F. (2010). Extracellular glutathione peroxidase (Gpx3) binds specifically to basement membranes of mouse renal cortex tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 298 (5): F1244-1253.
- Otaegui-Arrazola A., Menendez-Carreno M., Ansorena D. and Astiasaran I. (2010). Oxysterols: A world to explore. *Food Chem Toxicol*, 48 (12): 3289-3303.
- Ottaviano F.G., Handy D.E. and Loscalzo J. (2008). Redox regulation in the extracellular environment. *Circ J*, 72 (1): 1-16.
- Paiva S.A. and Russell R.M. (1999). Beta-carotene and other carotenoids as antioxidants. *J Am Coll Nutr*, 18 (5): 426-433.
- Palace V.P., Khaper N., Qin Q. and Singal P.K. (1999). Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. *Free Radic Biol Med*, 26 (5-6): 746-761.
- Palozza P., Serini S., Verdecchia S., Ameruso M., Trombino S., Picci N., Monego G. and Ranelletti F.O. (2007). Redox regulation of 7-ketocholesterol-induced apoptosis by beta-carotene in human macrophages. *Free Radic Biol Med*, 42 (10): 1579-1590.
- Palozza P., Simone R., Catalano A., Boninsegna A., Bohm V., Frohlich K., Mele M.C., Monego G. and Ranelletti F.O. (2010). Lycopene prevents 7-ketocholesterol-induced oxidative stress, cell cycle arrest and apoptosis in human macrophages. *J Nutr Biochem*, 21 (1): 34-46.
- Palozza P., Simone R., Catalano A., Monego G., Barini A., Mele M.C., Parrone N., Trombino S., Picci N. and Ranelletti F.O. (2011). Lycopene prevention of oxysterol-induced proinflammatory cytokine cascade in human macrophages: inhibition of NF-kappaB nuclear binding and increase in PPARgamma expression. *J Nutr Biochem*, 22 (3): 259-268.
- Pandey K.B. and Rizvi S.I. (2009). Protective effect of resveratrol on formation of membrane protein carbonyls and lipid peroxidation in erythrocytes subjected to oxidative stress. *Appl Physiol Nutr Metab*, 34 (6): 1093-1097.
- Panini S.R., Yang L., Rusinol A.E., Sinensky M.S., Bonventre J.V. and Leslie C.C. (2001). Arachidonate metabolism and the signaling pathway of induction of apoptosis by oxidized LDL/oxysterol. *J Lipid Res*, 42 (10): 1678-1686.
- Park Y., Ziegler T.R., Gletsu-Miller N., Liang Y., Yu T., Accardi C.J. and Jones D.P. (2010). Postprandial cysteine/cystine redox potential in human plasma varies with meal content of sulfur amino acids. *J Nutr*, 140 (4): 760-765.
- Pavlick K.P., Laroux F.S., Fuseler J., Wolf R.E., Gray L., Hoffman J. and Grisham M.B. (2002). Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease. *Free Radic Biol Med*, 33 (3): 311-322.
- Pedruzzi E., Guichard C., Ollivier V., Driss F., Fay M., Prunet C., Marie J.C., Pouzet C., Samadi M., Elbim C., O'Dowd Y., Bens M., Vandewalle A., Gougerot-Pocidallo M.A., Lizard G. and Ogier-Denis E. (2004). NAD(P)H oxidase Nox-4 mediates 7-ketocholesterol-induced

- endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *Mol Cell Biol*, 24 (24): 10703-10717.
- Peet D.J., Janowski B.A. and Mangelsdorf D.J. (1998). The LXRs: a new class of oxysterol receptors. *Curr Opin Genet Dev*, 8 (5): 571-575.
- Penn M.S. and Chisolm G.M. (1994). Oxidized lipoproteins, altered cell function and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 108 Suppl: S21-29.
- Perse M. (2013). Oxidative stress in the pathogenesis of colorectal cancer: cause or consequence? *Biomed Res Int*, 2013: 1-9.
- Peters W.H. and Roelofs H.M. (1989). Time-dependent activity and expression of glutathione S-transferases in the human colon adenocarcinoma cell line Caco-2. *Biochem J*, 264 (2): 613-616.
- Pinto D., Gregorieff A., Begthel H. and Clevers H. (2003). Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev*, 17 (14): 1709-1713.
- Pinto M., Robine-Leon S. and Appay M.D. (1983). Enterocyte-like differentiation and polarization of the human cell line CaCo-2 in culture *Biol. Cell.*, 47: 323-330.
- Plat J., Nichols J.A. and Mensink R.P. (2005). Plant sterols and stanols: effects on mixed micellar composition and LXR (target gene) activation. *J Lipid Res*, 46 (11): 2468-2476.
- Pokorny J. (2007). Are natural antioxidants better - and safer - than synthetic antioxidants? . *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 109: 629-642.
- Poli G., Biasi F. and Leonarduzzi G. (2013). Oxysterols in the pathogenesis of major chronic diseases. *Redox Biol*, 1 (1): 125-130.
- Pool-Zobel B., Veeriah S. and Bohmer F.D. (2005). Modulation of xenobiotic metabolising enzymes by anticarcinogens -- focus on glutathione S-transferases and their role as targets of dietary chemoprevention in colorectal carcinogenesis. *Mutat Res*, 591 (1-2): 74-92.
- Powis G., Mustacich D. and Coon A. (2000). The role of the redox protein thioredoxin in cell growth and cancer. *Free Radic Biol Med*, 29 (3-4): 312-322.
- Prasad A.S., Bao B., Beck F.W., Kucuk O. and Sarkar F.H. (2004). Antioxidant effect of zinc in humans. *Free Radic Biol Med*, 37 (8): 1182-1190.
- Prochazkova D., Bousova I. and Wilhelmova N. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 82 (4): 513-523.
- Prunet C., Montange T., Vejux A., Laubriet A., Rohmer J.F., Riedinger J.M., Athias A., Lemaire-Ewing S., Neel D., Petit J.M., Steinmetz E., Brenot R., Gambert P. and Lizard G. (2006). Multiplexed flow cytometric analyses of pro- and anti-inflammatory cytokines in the culture media of oxysterol-treated human monocytic cells and in the sera of atherosclerotic patients. *Cytometry A*, 69 (5): 359-373.
- Raffel J., Bhattacharyya A.K., Gallegos A., Cui H., Einspahr J.G., Alberts D.S. and Powis G. (2003). Increased expression of thioredoxin-1 in human colorectal cancer is associated with decreased patient survival. *J Lab Clin Med*, 142 (1): 46-51.
- Rahman K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin Interv Aging*, 2 (2): 219-236.

- Raingeaud J., Gupta S., Rogers J.S., Dickens M., Han J., Ulevitch R.J. and Davis R.J. (1995). Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem*, 270 (13): 7420-7426.
- Raman M., Chen W. and Cobb M.H. (2007). Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*, 26 (22): 3100-3112.
- Ramirez-Mares M.V. and de Mejia E.G. (2003). Comparative study of the antioxidant effect of ardisin and epigallocatechin gallate in rat hepatocytes exposed to benomyl and 1-nitropyrene. *Food Chem Toxicol*, 41 (11): 1527-1535.
- Ratnam D.V., Ankola D.D., Bhardwaj V., Sahana D.K. and Kumar M.N. (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *J Control Release*, 113 (3): 189-207.
- Rebrin I. and Sohal R.S. (2004). Comparison of thiol redox state of mitochondria and homogenates of various tissues between two strains of mice with different longevities. *Exp Gerontol*, 39 (10): 1513-1519.
- Reuter S., Gupta S.C., Chaturvedi M.M. and Aggarwal B.B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med*, 49 (11): 1603-1616.
- Rezaie A., Parker R.D. and Abdollahi M. (2007). Oxidative stress and pathogenesis of inflammatory bowel disease: an epiphenomenon or the cause? *Dig Dis Sci*, 52 (9): 2015-2021.
- Rice-Evans C. (2001). Flavonoid antioxidants. *Curr Med Chem*, 8 (7): 797-807.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J. and Paganga G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med*, 20 (7): 933-956.
- Ringseis R. and Eder K. (2004). Dietary oxidized cholesterol increases expression and activity of antioxidative enzymes and reduces the concentration of glutathione in the liver of rats. *Int J Vitam Nutr Res*, 74 (1): 86-92.
- Rodrigo R., Castillo R., Carrasco R., Huerta P. and Moreno M. (2005). Diminution of tissue lipid peroxidation in rats is related to the in vitro antioxidant capacity of wine. *Life Sci*, 76 (8): 889-900.
- Rodrigo R., Rivera G., Orellana M., Araya J. and Bosco C. (2002). Rat kidney antioxidant response to long-term exposure to flavonol rich red wine. *Life Sci*, 71 (24): 2881-2895.
- Rokutan K., Kawahara T., Kuwano Y., Tominaga K., Nishida K. and Teshima-Kondo S. (2008). Nox enzymes and oxidative stress in the immunopathology of the gastrointestinal tract. *Semin Immunopathol*, 30 (3): 315-327.
- Rokutan K., Kawahara T., Kuwano Y., Tominaga K., Sekiyama A. and Teshima-Kondo S. (2006). NADPH oxidases in the gastrointestinal tract: a potential role of Nox1 in innate immune response and carcinogenesis. *Antioxid Redox Signal*, 8 (9-10): 1573-1582.
- Romier B., Schneider Y.J., Larondelle Y. and During A. (2009). Dietary polyphenols can modulate the intestinal inflammatory response. *Nutr Rev*, 67 (7): 363-378.
- Ronkina N., Kotlyarov A. and Gaestel M. (2008). MK2 and MK3--a pair of isoenzymes? *Front Biosci*, 13: 5511-5521.

- Rosenblat M. and Aviram M. (2002). Oxysterol-induced activation of macrophage NADPH-oxidase enhances cell-mediated oxidation of LDL in the atherosclerotic apolipoprotein E deficient mouse: inhibitory role for vitamin E. *Atherosclerosis*, 160 (1): 69-80.
- Rosenkranz S., Knirel D., Dietrich H., Flesch M., Erdmann E. and Bohm M. (2002). Inhibition of the PDGF receptor by red wine flavonoids provides a molecular explanation for the "French paradox". *FASEB J*, 16 (14): 1958-1960.
- Roskint T., Ohlsson B.G., Wiklund O., Noren K. and Hulten L.M. (2002). Oxysterols induce interleukin-1beta production in human macrophages. *Eur J Clin Invest*, 32 (1): 35-42.
- Rotruck J.T., Pope A.L., Ganther H.E., Swanson A.B., Hafeman D.G. and Hoekstra W.G. (1973). Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*, 179 (4073): 588-590.
- Rousset M., Laburthe M., Pinto M., Chevalier G., Rouyer-Fessard C., Dussaulx E., Trugnan G., Boige N., Brun J.L. and Zweibaum A. (1985). Enterocytic differentiation and glucose utilization in the human colon tumor cell line Caco-2: modulation by forskolin. *J Cell Physiol*, 123 (3): 377-385.
- Roussi S., Gosse F., Aoude-Werner D., Zhang X., Marchioni E., Geoffroy P., Miesch M. and Raul F. (2007). Mitochondrial perturbation, oxidative stress and lysosomal destabilization are involved in 7beta-hydroxysterol and 7beta-hydroxycholesterol triggered apoptosis in human colon cancer cells. *Apoptosis*, 12 (1): 87-96.
- Roussi S., Winter A., Gosse F., Werner D., Zhang X., Marchioni E., Geoffroy P., Miesch M. and Raul F. (2005). Different apoptotic mechanisms are involved in the antiproliferative effects of 7b-hydroxysterol and 7b-hydroxycholesterol in human colon cancer cells. *Cell Death Differ*, 12 (2): 128-135.
- Royer-Pokora B., Kunkel L.M., Monaco A.P., Goff S.C., Newburger P.E., Baehner R.L., Cole F.S., Curnutte J.T. and Orkin S.H. (1986). Cloning the gene for an inherited human disorder--chronic granulomatous disease--on the basis of its chromosomal location. *Nature*, 322 (6074): 32-38.
- Ryan E., Chopra J., McCarthy F., Maguire A.R. and O'Brien N.M. (2005). Qualitative and quantitative comparison of the cytotoxic and apoptotic potential of phytosterol oxidation products with their corresponding cholesterol oxidation products. *Br J Nutr*, 94 (3): 443-451.
- Ryan E., McCarthy F.O., Maguire A.R. and O'Brien N.M. (2009). Phytosterol oxidation products: their formation, occurrence, and biological effects. *Food Rev Int*, 25 (2): 157-174.
- Ryan L., O'Callaghan Y.C. and O'Brien N.M. (2004). Generation of an oxidative stress precedes caspase activation during 7beta-hydroxycholesterol-induced apoptosis in U937 cells. *J Biochem Mol Toxicol*, 18 (1): 50-59.
- Rydberg E.K., Salomonsson L., Hulten L.M., Noren K., Bondjers G., Wiklund O., Bjornheden T. and Ohlsson B.G. (2003). Hypoxia increases 25-hydroxycholesterol-induced interleukin-8 protein secretion in human macrophages. *Atherosclerosis*, 170 (2): 245-252.
- Sabapathy K., Hochedlinger K., Nam S.Y., Bauer A., Karin M. and Wagner E.F. (2004). Distinct roles for JNK1 and JNK2 in regulating JNK activity and c-Jun-dependent cell proliferation. *Mol Cell*, 15 (5): 713-725.

- Sadik C.D., Sies H. and Schewe T. (2003). Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonoids: structure-activity relations and mode of action. *Biochem Pharmacol*, 65 (5): 773-781.
- Sadok A., Bourgarel-Rey V., Gattacceca F., Penel C., Lehmann M. and Kovacic H. (2008). Nox1-dependent superoxide production controls colon adenocarcinoma cell migration. *Biochim Biophys Acta*, 1783 (1): 23-33.
- Salonen J.T. (2000). Markers of oxidative damage and antioxidant protection: assessment of LDL oxidation. *Free Radic Res*, 33 Suppl: S41-46.
- Santangelo C., Vari R., Scazzocchio B., Di Benedetto R., Filesi C. and Masella R. (2007). Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Ann Ist Super Sanità*, 43 (4): 394-405.
- Scalbert A., Manach C., Morand C., Remesy C. and Jimenez L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 45 (4): 287-306.
- Scalbert A. and Williamson G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr*, 130 (8S Suppl): 2073S-2085S.
- Schafer F.Q. and Buettner G.R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med*, 30 (11): 1191-1212.
- Scharf G., Prustomersky S., Knasmuller S., Schulte-Hermann R. and Huber W.W. (2003). Enhancement of glutathione and g-glutamylcysteine synthetase, the rate limiting enzyme of glutathione synthesis, by chemoprotective plant-derived food and beverage components in the human hepatoma cell line HepG2. *Nutr Cancer*, 45 (1): 74-83.
- Scharrer E., Senn E. and Wolfram S. (1992). Stimulation of mucosal uptake of selenium from selenite by some thiols at various sites of rat intestine. *Biol Trace Elem Res*, 33: 109-120.
- Schepens M.A., Vink C., Schonewille A.J., Roelofs H.M., Brummer R.J., van der Meer R. and Bovee-Oudenhoven I.M. (2011). Supplemental antioxidants do not ameliorate colitis development in HLA-B27 transgenic rats despite extremely low glutathione levels in colonic mucosa. *Inflamm Bowel Dis*, 17 (10): 2065-2075.
- Schewe T., Sadik C., Klotz L.O., Yoshimoto T., Kuhn H. and Sies H. (2001). Polyphenols of cocoa: inhibition of mammalian 15-lipoxygenase. *Biol Chem*, 382 (12): 1687-1696.
- Schomburg L. and Kohrle J. (2008). On the importance of selenium and iodine metabolism for thyroid hormone biosynthesis and human health. *Mol Nutr Food Res*, 52 (11): 1235-1246.
- Seo S.R., Chong S.A., Lee S.I., Sung J.Y., Ahn Y.S., Chung K.C. and Seo J.T. (2001). Zn²⁺-induced ERK activation mediated by reactive oxygen species causes cell death in differentiated PC12 cells. *J Neurochem*, 78 (3): 600-610.
- Sergeev I.N. (2004). Genistein induces Ca²⁺-mediated, calpain/caspase-12-dependent apoptosis in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 321 (2): 462-467.
- Sevanian A., Seraglia R., Traldi P., Rossato P., Ursini F. and Hodis H. (1994). Analysis of plasma cholesterol oxidation products using gas- and high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Free Radic Biol Med*, 17 (5): 397-409.
- Shan X.Q., Aw T.Y. and Jones D.P. (1990). Glutathione-dependent protection against oxidative injury. *Pharmacol Ther*, 47 (1): 61-71.

- Shirai T., Asamoto M., Takahashi S. and Imaida K. (2002). Diet and prostate cancer. *Toxicology*, 181-182 89-94.
- Sido B., Hack V., Hochlehnert A., Lipps H., Herfarth C. and Droge W. (1998). Impairment of intestinal glutathione synthesis in patients with inflammatory bowel disease. *Gut*, 42 (4): 485-492.
- Sies H. (1985). Oxidative stress: Introductory remarks. In *Oxidative stress*. Sies H.E. Eds. Academic Press, London: 1-8.
- Smith L.L. and Johnson B.H. (1989). Biological activities of oxysterols. *Free Radic Biol Med*, 7 (3): 285-332.
- Snary D., Allen A. and Pain R.H. (1970). Structural studies on gastric mucoproteins: lowering of molecular weight after reduction with 2-mercaptoethanol. *Biochem Biophys Res Commun*, 40 (4): 844-851.
- Soto C., Recoba R., Barron H., Alvarez C. and Favari L. (2003). Silymarin increases antioxidant enzymes in alloxan-induced diabetes in rat pancreas. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 136 (3): 205-212.
- Sottero B., Gamba P., Gargiulo S., Leonarduzzi G. and Poli G. (2009). Cholesterol oxidation products and disease: an emerging topic of interest in medicinal chemistry. *Curr Med Chem*, 16 (6): 685-705.
- Spencer J.P., Rice-Evans C. and Williams R.J. (2003). Modulation of pro-survival Akt/protein kinase B and ERK1/2 signaling cascades by quercetin and its in vivo metabolites underlie their action on neuronal viability. *J Biol Chem*, 278 (37): 34783-34793.
- Spencer J.P.E., Srai S.K. and Rice-Evans C. (2003). Metabolism in the small intestine and gastrointestinal tract. In *Flavonoids in health and disease*. Rice-Evans C. and Parker L.E. Eds. Marcel Dekker, New York: 363-390.
- Stanciu M., Wang Y., Kentor R., Burke N., Watkins S., Kress G., Reynolds I., Klann E., Angiolieri M.R., Johnson J.W. and DeFranco D.B. (2000). Persistent activation of ERK contributes to glutamate-induced oxidative toxicity in a neuronal cell line and primary cortical neuron cultures. *J Biol Chem*, 275 (16): 12200-12206.
- Steele V.E., Kelloff G.J., Balentine D., Boone C.W., Mehta R., Bagheri D., Sigman C.C., Zhu S. and Sharma S. (2000). Comparative chemopreventive mechanisms of green tea, black tea and selected polyphenol extracts measured by in vitro bioassays. *Carcinogenesis*, 21 (1): 63-67.
- Steenvoorden D.P. and van Henegouwen G.M. (1997). The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection. *J Photochem Photobiol B*, 41 (1-2): 1-10.
- Steinbrecher U.P., Zhang H.F. and Lougheed M. (1990). Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis. *Free Radic Biol Med*, 9 (2): 155-168.
- Stipanuk M.H. (2004). Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. *Annu Rev Nutr*, 24: 539-577.
- Storz P. (2005). Reactive oxygen species in tumor progression. *Front Biosci*, 10: 1881-1896.
- Suh Y.A., Arnold R.S., Lassegue B., Shi J., Xu X., Sorescu D., Chung A.B., Griendling K.K. and Lambeth J.D. (1999). Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature*, 401 (6748): 79-82.

- Sun Y. and Rigas B. (2008). The thioredoxin system mediates redox-induced cell death in human colon cancer cells: implications for the mechanism of action of anticancer agents. *Cancer Res*, 68 (20): 8269-8277.
- Tabassum A., Bristow R.G. and Venkateswaran V. (2010). Ingestion of selenium and other antioxidants during prostate cancer radiotherapy: a good thing? *Cancer Treat Rev*, 36 (3): 230-234.
- Tabata K. and Johnson L.R. (1986). Ornithine decarboxylase and mucosal growth in response to feeding. *Am J Physiol*, 251 (2 Pt 1): G270-274.
- Tang R. and Huang K. (2004). Inhibiting effect of selenium on oxysterols-induced apoptosis of rat vascular smooth muscle cells. *J Inorg Biochem*, 98 (11): 1678-1685.
- Tang R., Liu H., Wang T. and Huang K. (2005). Mechanisms of selenium inhibition of cell apoptosis induced by oxysterols in rat vascular smooth muscle cells. *Arch Biochem Biophys*, 441 (1): 16-24.
- Tedgui A. and Mallat Z. (2006). Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev*, 86 (2): 515-581.
- Templar J., Kon S.P., Milligan T.P., Newman D.J. and Raftery M.J. (1999). Increased plasma malondialdehyde levels in glomerular disease as determined by a fully validated HPLC method. *Nephrol Dial Transplant*, 14 (4): 946-951.
- Terpinc P., Polak T., Segatin N., Hanzlowsky A., Ulrich N.P. and Abramovic H. (2011). Antioxidant properties of 4-vinyl derivatives of hydroxycinnamic acids. *Food Chem.*, 128 62-68.
- Tham D.M., Whittin J.C. and Cohen H.J. (2002). Increased expression of extracellular glutathione peroxidase in mice with dextran sodium sulfate-induced experimental colitis. *Pediatr Res*, 51 (5): 641-646.
- Thomas J.P., Geiger P.G., Maiorino M., Ursini F. and Girotti A.W. (1990). Enzymatic reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides in artificial bilayers and lipoproteins. *Biochim Biophys Acta*, 1045 (3): 252-260.
- Thornton T.M. and Rincon M. (2009). Non-classical p38 map kinase functions: cell cycle checkpoints and survival. *Int J Biol Sci*, 5 (1): 44-51.
- Tian J., Washizawa N., Gu L.H., Levin M.S., Wang L., Rubin D.C., Mwangi S., Srinivasan S., Gao Y., Jones D.P. and Ziegler T.R. (2007). Stimulation of colonic mucosal growth associated with oxidized redox status in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 292 (3): R1081-1091.
- Toppo S., Vanin S., Bosello V. and Tosatto S.C. (2008). Evolutionary and structural insights into the multifaceted glutathione peroxidase (Gpx) superfamily. *Antioxid Redox Signal*, 10 (9): 1501-1514.
- Torres M. and Forman H.J. (2003). Redox signaling and the MAP kinase pathways. *Biofactors*, 17 (1-4): 287-296.
- Touyz R.M. (2004). Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension*, 44 (3): 248-252.

- Tsunada S., Iwakiri R., Fujimoto K. and Aw T.Y. (2003a). Chronic lipid hydroperoxide stress suppresses mucosal proliferation in rat intestine: potentiation of ornithine decarboxylase activity by epidermal growth factor. *Dig Dis Sci*, 48 (12): 2333-2341.
- Tsunada S., Iwakiri R., Noda T., Fujimoto K., Fuseler J., Rhoads C.A. and Aw T.Y. (2003b). Chronic exposure to subtoxic levels of peroxidized lipids suppresses mucosal cell turnover in rat small intestine and reversal by glutathione. *Dig Dis Sci*, 48 (1): 210-222.
- Tuberoso C.I.G., Boban M., Bifulco E., Budimir D. and Pirisi F.M. (2013). Antioxidant capacity and vasodilatory properties of Mediterranean food: the case of Cannonau wine, myrtle berries liqueur and strawberry-tree honey. *Food Chem*, 140 (4): 686-691.
- Turunen M., Olsson J. and Dallner G. (2004). Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim Biophys Acta*, 1660 (1-2): 171-199.
- Ursini F., Maiorino M., Brigelius-Flohe R., Aumann K.D., Roveri A., Schomburg D. and Flohe L. (1995). Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol*, 252: 38-53.
- Ursini F., Maiorino M., Valente M., Ferri L. and Gregolin C. (1982). Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. *Biochim Biophys Acta*, 710 (2): 197-211.
- van den Brink M.R., Kapeller R., Pratt J.C., Chang J.H. and Burakoff S.J. (1999). The extracellular signal-regulated kinase pathway is required for activation-induced cell death of T cells. *J Biol Chem*, 274 (16): 11178-11185.
- Van Hoorn D.E., Nijveldt R.J., Van Leeuwen P.A., Hofman Z., M'Rabet L., De Bont D.B. and Van Norren K. (2002). Accurate prediction of xanthine oxidase inhibition based on the structure of flavonoids. *Eur J Pharmacol*, 451 (2): 111-118.
- Van Houten B., Woshner V. and Santos J.H. (2006). Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress. *DNA Repair (Amst)*, 5 (2): 145-152.
- Vaya J., Aviram M., Mahmood S., Hayek T., Grenadir E., Hoffman A. and Milo S. (2001). Selective distribution of oxysterols in atherosclerotic lesions and human plasma lipoproteins. *Free Radic Res*, 34 (5): 485-497.
- Vaya J. and Schipper H.M. (2007). Oxysterols, cholesterol homeostasis, and Alzheimer disease. *J Neurochem*, 102 (6): 1727-1737.
- Vejux A. and Lizard G. (2009). Cytotoxic effects of oxysterols associated with human diseases: Induction of cell death (apoptosis and/or oncosis), oxidative and inflammatory activities, and phospholipidosis. *Mol Aspects Med*, 30 (3): 153-170.
- Vejux A., Malvitte L. and Lizard G. (2008). Side effects of oxysterols: cytotoxicity, oxidation, inflammation, and phospholipidosis. *Braz J Med Biol Res*, 41 (7): 545-556.
- Vera J.C., Reyes A.M., Carcamo J.G., Velasquez F.V., Rivas C.I., Zhang R.H., Strobel P., Iribarren R., Scher H.I., Slebe J.C. and et al. (1996). Genistein is a natural inhibitor of hexose and dehydroascorbic acid transport through the glucose transporter, GLUT1. *J Biol Chem*, 271 (15): 8719-8724.
- Vervoort L.M., Ronden J.E. and Thijssen H.H. (1997). The potent antioxidant activity of the vitamin K cycle in microsomal lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol*, 54 (8): 871-876.

- Vincenzini M.T., Iantomasi T. and Favilli F. (1989). Glutathione transport across intestinal brush-border membranes: effects of ions, pH, delta psi, and inhibitors. *Biochim Biophys Acta*, 987 (1): 29-37.
- Virgili F. and Marino M. (2008). Regulation of cellular signals from nutritional molecules: a specific role for phytochemicals, beyond antioxidant activity. *Free Radic Biol Med*, 45 (9): 1205-1216.
- Vodret A. (2003). *Storia regionale della vite e del vino in Sardegna*. Editor Eds. Milano, Italia:
- Walle T. (2004). Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radic Biol Med*, 36 (7): 829-837.
- Walle T., Browning A.M., Steed L.L., Reed S.G. and Walle U.K. (2005). Flavonoid glucosides are hydrolyzed and thus activated in the oral cavity in humans. *J Nutr*, 135 (1): 48-52.
- Wallerath T., Poleo D., Li H. and Forstermann U. (2003). Red wine increases the expression of human endothelial nitric oxide synthase: a mechanism that may contribute to its beneficial cardiovascular effects. *J Am Coll Cardiol*, 41 (3): 471-478.
- Wang P.Y., Weng J. and Anderson R.G. (2005). OSBP is a cholesterol-regulated scaffolding protein in control of ERK 1/2 activation. *Science*, 307 (5714): 1472-1476.
- Watabe M., Kawazoe N., Masuda Y., Nakajo S. and Nakaya K. (1997). Bcl-2 protein inhibits bufalin-induced apoptosis through inhibition of mitogen-activated protein kinase activation in human leukemia U937 cells. *Cancer Res*, 57 (15): 3097-3100.
- Waterhouse A.L. (2002). Wine phenolics. *Ann N Y Acad Sci*, 957: 21-36.
- Waterhouse A.L. (2006). Wine chemistry: a basic introduction *S. Afr. J. Enol.Vitic.*, 27: 113-116.
- Way T.D., Kao M.C. and Lin J.K. (2005). Degradation of HER2/neu by apigenin induces apoptosis through cytochrome c release and caspase-3 activation in HER2/neu-overexpressing breast cancer cells. *FEBS Lett*, 579 (1): 145-152.
- Whitin J.C., Bhamre S., Tham D.M. and Cohen H.J. (2002). Extracellular glutathione peroxidase is secreted basolaterally by human renal proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 283 (1): F20-28.
- Widmann C., Gibson S., Jarpe M.B. and Johnson G.L. (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev*, 79 (1): 143-180.
- Wiseman S., Mulder T. and Rietveld A. (2001). Tea flavonoids: bioavailability in vivo and effects on cell signaling pathways in vitro. *Antioxid Redox Signal*, 3 (6): 1009-1021.
- Witztum J.L. and Steinberg D. (2001). The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans? *Trends Cardiovasc Med*, 11 (3-4): 93-102.
- Wohlfeil E.R. and Campbell W.B. (1997). 25-Hydroxycholesterol enhances eicosanoid production in cultured bovine coronary artery endothelial cells by increasing prostaglandin G/H synthase-2. *Biochim Biophys Acta*, 1345 (1): 109-120.
- www.sardegnaagricoltura.it Vini di Sardegna. Laore Sardegna.
- Xia Z., Dickens M., Raugeaud J., Davis R.J. and Greenberg M.E. (1995). Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*, 270 (5240): 1326-1331.

- Yamada T. and Grisham M.B. (1991). Role of neutrophil-derived oxidants in the pathogenesis of intestinal inflammation. *Klin Wochenschr*, 69 (21-23): 988-994.
- Yoon J.H., Canbay A.E., Werneburg N.W., Lee S.P. and Gores G.J. (2004). Oxysterols induce cyclooxygenase-2 expression in cholangiocytes: implications for biliary tract carcinogenesis. *Hepatology*, 39 (3): 732-738.
- Youkin A., Hauri H.P. and Sterchi E. (1989). Decrease in polyactosaminoglycans associated with lysosomal membrane glycoproteins during differentiation of CaCo-2 human colonic adenocarcinoma cells. *Cancer Res*, 49: 6889-6895.
- Yuan X.M., Li W., Brunk U.T., Dalen H., Chang Y.H. and Sevanian A. (2000). Lysosomal destabilization during macrophage damage induced by cholesterol oxidation products. *Free Radic Biol Med*, 28 (2): 208-218.