

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO  
Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari  
Scuola di Dottorato in Scienze Farmacologiche  
XXVII ciclo BIO 14



**STUDIO DEI MECCANISMI DI DANNO DA RAGGI  
UVA E UVB E DEGLI EFFETTI PROTETTIVI DA  
PARTE DI COMPOSTI POLIFENOLICI IN SISTEMI  
CELLULARI E MODELLI *EX VIVO* DI CUTE UMANA**

Tutor: Dott.ssa Laura MARABINI

Direttore della Scuola: Prof. Alberto E. PANERAI

Tesi di Dottorato di Ricerca:

Dott.ssa Rossella Calò

Matr. n. R09586

Anno Accademico 2013-2014



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO**  
**SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE**  
**FARMACOLOGICHE**

Dipartimento di Scienze Farmacologiche  
e Biomolecolari

**STUDIO DEI MECCANISMI DI DANNO DA RAGGI**  
**UVA E UVB E DEGLI EFFETTI PROTETTIVI DA**  
**PARTE DI COMPOSTI POLIFENOLICI IN SISTEMI**  
**CELLULARI E MODELLI *EX VIVO* DI CUTE UMANA**

Tutor: Dott.ssa Laura MARABINI

Direttore della Scuola: Prof. Alberto E. PANERAI

Tesi di Dottorato di Ricerca:

Dott.ssa Rossella Calò

Matr. n. R09586

Anno Accademico 2013-2014

# **INDICE**

<b>RIASSUNTO</b>	<b>5</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>9</b>
<b>INTRODUZIONE</b>	<b>13</b>
1. La pelle	13
2. Modelli sperimentali	18
3. Lo spettro elettromagnetico	23
3.1 UVA	27
3.2 UVB	30
3.3 UVC	32
4. Fotocancerogenesi	32
5. Tumori cutanei	34
6. Antiossidanti endogeni	36
6.1 Superossido dismutasi (SOD)	37
6.2 Catalasi (CAT)	38
6.3 Glutazione perossidasi (GPx)	38
7. Antiossidanti esogeni	39
7.1 Vitamine	39
7.2 Carotenoidi	40
7.3 Polifenoli	41
7.3.1 Acidi fenolici	41
7.3.2 Lignani	41
7.3.3 Stilbeni	41
7.3.4 Flavonoidi	42
8. <i>Vaccinium Myrtillus</i>	47
9. Timolo	52
<b>SCOPO DELLA RICERCA</b>	<b>55</b>
<b>MATERIALI E METODI</b>	<b>60</b>
1. Sistemi sperimentali	60
1.1 Colture cellulari ( <i>in vitro</i> )	60

1.2 Colture organotipiche ( <i>ex vivo</i> )	60
2. Sistema di irradiazione UV	61
3. Composti di origine naturale testati	62
3.1 Preparati liofilizzati di <i>Vaccinium Myrtillus</i>	62
3.1.1 Pretrattamento con <i>Vaccinium Myrtillus</i> ( <i>in vitro</i> )	62
3.2 Timo ed estratto di Timo ( <i>Thymus Vulgaris L.</i> )	62
3.2.1 Pretrattamento con timo ed estratto di Timo ( <i>Thymus Vulgaris L.</i> , <i>in vitro</i> ed <i>ex vivo</i> )	63
4. Dosi di irradiazione UVA e UVB	63
5. Test di citotossicità	64
5.1 Test di vitalità cellulare (MTT, <i>in vitro</i> )	64
5.2 Test di danno tissutale (LDH Activity Test, <i>ex vivo</i> )	64
5.2.1 Retta standard LDH	65
6. Analisi morfologica delle sezioni di cute umana	65
6.1 Colorazione con Ematossilina-Eosina	65
6.2 Analisi della proliferazione cellulare mediante saggio con 5'-Bromo-2'-deossiuridina	66
7. Analisi del ciclo cellulare ( <i>in vitro</i> ed <i>ex vivo</i> )	67
8. Valutazione dello stato di ossidazione cellulare ( <i>in vitro</i> )	68
8.1 Test di valutazione della quantità intracellulare di ROS	68
8.2 Valutazione della lipoperossidazione	69
8.2.1 Retta MDA	70
8.3 Dosaggio delle proteine	70
9. Test di genotossicità ( <i>in vitro</i> ed <i>ex vivo</i> )	71
9.1 Comet test alcalino (pH>13)	71
9.2 Test dell'istone H2AX fosforilato ( $\gamma$ -H2AX)	74
9.2.1 Test dell'istone H2AX fosforilato ( $\gamma$ -H2AX, <i>in vitro</i> )	75
9.2.2 Test dell'istone H2AX fosforilato ( $\gamma$ -H2AX) su sezioni in paraffina ( <i>ex vivo</i> )	76
9.3 Test del micronucleo (MN)	77
10. Test di valutazione dell'apoptosi	79
10.1 Valutazione del potenziale di membrana mitocondriale (JC-1)	79

10.2 Test dell'Annessina V ( <i>in vitro</i> ed <i>ex vivo</i> )	80
11. Analisi statistica	81
<b>RISULTATI</b>	<b>82</b>
1. Test di citotossicità	82
1.1 Test di vitalità cellulare (MTT test, <i>in vitro</i> )	82
1.2 Test di danno tissutale (LDH Activity Test, <i>ex vivo</i> )	84
2. Analisi morfologica delle sezioni di cute umana	85
2.1 Colorazione con Ematossilina-Eosina	85
2.2 Analisi della proliferazione cellulare mediante saggio con 5'-Bromo-2'-deossiuridina	85
3. Analisi del ciclo cellulare	86
3.1 Analisi del ciclo cellulare ( <i>in vitro</i> )	86
3.2 Analisi del ciclo cellulare ( <i>ex vivo</i> )	88
4. Valutazione dello stato di ossidazione cellulare ( <i>in vitro</i> )	88
4.1 Valutazione della quantità intracellulare di ROS	88
4.2 Valutazione della lipoperossidazione	90
5. Test di genotossicità	91
5.1 Comet test alcalino (pH>13, <i>in vitro</i> )	91
5.2 Comet test alcalino (pH>13, <i>ex vivo</i> )	92
5.3 Test dell'istone H2AX fosforilato ( $\gamma$ -H2AX)	92
5.3.1 Test dell'istone H2AX fosforilato ( $\gamma$ -H2AX, <i>in vitro</i> )	93
5.3.2 Test dell'istone H2AX fosforilato ( $\gamma$ -H2AX) su sezioni in paraffina ( <i>ex vivo</i> )	94
5.4 Test del micronucleo (MN)	95
5.4.1 Test del micronucleo (MN, <i>in vitro</i> )	95
5.4.2 Test del micronucleo (MN, <i>ex vivo</i> )	96
6. Test di valutazione dell'apoptosi	97
6.1 Valutazione del potenziale di membrana mitocondriale (JC-1)	97
6.2 Test dell'Annessina V	97
6.2.1 Test dell'Annessina V ( <i>in vitro</i> )	97
6.2.2 Test dell'Annessina V ( <i>ex vivo</i> )	98
<b>DISCUSSIONE</b>	<b>99</b>

**BIBLIOGRAFIA**

**111**

**FIGURE**

**127**

## **RIASSUNTO**

Il sole emette diversi tipi di radiazioni appartenenti allo spettro elettromagnetico, il quale è suddiviso in diverse regioni: gli ultravioletti, lo spettro del visibile e gli infrarossi. La componente ultravioletta è un importante fattore naturale che presenta numerosi effetti benefici sulla salute dell'uomo tra cui attività disinfettante, proprietà immunoregatorie, stimolazione della produzione di vitamina D e serotonina. E' noto che le fonti artificiali di UVR vengano utilizzate per garantire la sterilità di utensili e ambienti ospedalieri, per scopi terapeutici come il trattamento di psoriasi, vitiligine ed ittero neonatale, ma anche per finalità estetiche (lampade abbronzanti). A questi vantaggiosi utilizzi si affiancano però una serie di studi che da qualche decennio dimostrano anche l'azione dannosa dei raggi ultravioletti sulla cute, correlando in maniera diretta l'esposizione alla luce solare e l'insorgenza di tumori cutanei.

A seconda della lunghezza d'onda la radiazione ultravioletta è suddivisa in tre regioni: UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm) e UVC (100-280 nm). La regione degli UVC, sicuramente più citotossica e dannosa, è interamente assorbita dallo strato di ozono presente nella stratosfera, di conseguenza le componenti ultraviolette di maggiore interesse nello studio della fotocancerogenesi sono le radiazioni ultraviolette A (UVA) e le radiazioni ultraviolette B (UVB). La quantità di questi raggi che raggiunge la superficie terrestre e il rapporto UVA/UVB dipende da diversi fattori ambientali come la latitudine, la stagione, il tempo meteorologico e l'ora del giorno.

I raggi UVA costituiscono la maggior componente ultravioletta che arriva sulla terra (il 90-95% della radiazione UV totale), penetrano nella cute fino al derma e agiscono promuovendo la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) che sono in grado di ossidare molteplici componenti cellulari come carboidrati, lipidi, proteine e DNA. L'interazione tra i ROS e la doppia elica può portare a fenomeni di rottura del singolo filamento (SSB), crosslink tra DNA e proteine e soprattutto ossidazione delle basi. La base più suscettibile all'ossidazione è la guanina che diventa 8-oxo-7,8-diidroguanina, importante promotore di fenomeni di cancerogenesi.

L'irradiazione UVB raggiunge solo per il 5% la superficie terrestre e nonostante sia in grado di penetrare solo fino allo strato epidermico della cute risulta comunque estremamente dannosa a

causa dell'alta energia che possiede. Gli UVB, infatti, sono direttamente assorbiti dal DNA e generano la produzione di fotoprodotto (6-4 pirimidina-pirimidone fotoprodotto, 6-4 PP) e soprattutto dimeri di pirimidine (CPDs) che possono portare a fenomeni apoptotici o di cancerogenesi. Anche gli aminoacidi aromatici come il triptofano e la tirosina sono potenti cromofori dei raggi UVB e le loro modificazioni possono alterare la struttura e quindi la funzione delle proteine. Oltre a questo, gli UVB sono in grado di produrre anche specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dell'azoto (RNS).

Le cellule possiedono tuttavia dei meccanismi di difesa e di riparo endogeni in grado di fronteggiare il danno genotossico UV mediato: complessi di difesa antiossidante tra cui un gruppo di enzimi che sfruttano la presenza di un metallo per ridurre le specie reattive dell'ossigeno, e sistemi di riparazione del DNA come quello per escissione di basi (BER), usato per lesioni lievi come le basi ossidate, e quello per escissione di nucleotidi (NER), specifico per le fotolesioni come CPD e 6-4 PP. Negli ultimi decenni, numerose molecole sono state studiate al fine di supportare e/o coadiuvare questi meccanismi. Per questo motivo, l'attenzione è stata rivolta soprattutto a composti di origine naturale in quanto in grado di svolgere lo stesso effetto delle molecole sintetiche e perché generalmente utilizzati come supplemento in integratori alimentari inseriti nella dieta. E' noto, infatti, che in natura esistano composti con un'alta attività antiossidante come le vitamine C ed E, i carotenoidi e i polifenoli. Questi ultimi mostrano un'ampia varietà di effetti benefici, anche nell'uomo, come attività antiossidante, induzione di pathway di riparazione del DNA e modulazione dei processi infiammatori e apoptotici.

Studi epidemiologici hanno confermato le attività biologiche ed l'efficacia dei polifenoli contro malattie cardiovascolari, respiratorie, neurodegenerative, infiammatorie e tumorali.

Lo scopo del lavoro di tesi di dottorato è stato duplice: dapprima confermare i dati presenti in letteratura riguardo alla diversa tipologia di danno causato da UVA e UVB e successivamente valutare l'attività di tre composti di origine naturale, appartenenti tutti alla categoria dei polifenoli, nei confronti dei suddetti danni. I vari test sono stati condotti in due linee cellulari immortalizzate (*in vitro*) di cheratinociti umani con diverso grado di differenziazione (NCTC-2544 e HaCaT) e in un modello di cute umana (*ex vivo*) proveniente da biopsie di addominoplastica, dopo consenso informato. I composti di origine naturale testati in questo studio sono: estratto di *Vaccinium Myrtillus* (una specie di mirtillo con un'altissima



concentrazione di polifenoli e con il maggior contenuto di antocianine), timolo (prodotto sintetico) ed estratto di *Thymus Vulgaris L.*, in cui il timolo è il principale costituente, al fine di valutare eventuali differenze attribuibili alla presenza di altri composti nell'estratto. Timolo ed estratto di *Thymus Vulgaris L.* sono stati usati in concentrazioni comparabili, in tutti e due i modelli. In ogni modello, i campioni sono stati pretrattati per un'ora con ogni composto in terreno senza siero e poi irradiati con UVA o UVB. I campioni controllo sono stati trattati nello stesso modo, ma non esposti ai raggi UV.

Per poter confermare i dati presenti in letteratura riguardanti il differente tipo di danno causato da UVA e UVB e confrontare i dati ottenuti nei due modelli sperimentali, sono stati effettuati test in grado di valutare il danno ossidativo (test di valutazione dei ROS e della lipoperossidazione di membrana), il danno genotossico (tramite comet test, test dell'istone H2AX fosforilato e test dei micronuclei) e quello apoptotico (valutazione del potenziale di membrana del mitocondrio e test dell'annessina V). Successivamente, con gli stessi test, è stato valutato l'effetto protettivo dell'estratto di *Vaccinium Myrtillus*, del timolo e dell'estratto di *Thymus Vulgaris L.* Mentre l'efficacia protettiva di *Vaccinium Myrtillus* è stata valutata solo nei modelli *in vitro*, l'effetto di timolo ed estratto di *Thymus Vulgaris L.* è stato studiato in entrambi i modelli (*in vitro* ed *ex vivo*).

I risultati dei test effettuati hanno permesso di confermare in tutti i modelli utilizzati in questo progetto la presenza di un differente meccanismo di azione del danno indotto dai raggi UVA rispetto a quello indotto dagli UVB. In particolare è stato dimostrato che i raggi UVA sono quelli con maggiore capacità ossidante; gli UVB, invece, hanno principalmente attività genotossica e proapoptotica.

Differente è risultata anche la capacità protettiva dell'estratto di *Vaccinium Myrtillus*, del timolo e dell'estratto di *Thymus Vulgaris L.* nei confronti delle due regioni del campo ultravioletto. Inoltre, timolo e dell'estratto di *Thymus Vulgaris L.* sono state in grado di dare protezione sia alle linee cellulari NCTC 2544 e HaCaT che alle biopsie di cute umana.

I tre composti di origine naturale sono risultati efficaci, anche se con entità differente, nel ridurre il danno indotto dai raggi UVA grazie alla loro capacità antiossidante. L'effetto protettivo nei confronti dei danni provocati dagli UVB è presente anche se di entità minore ed è dato,

probabilmente, dalla capacità di queste sostanze di stimolare i pathway di riparazione del DNA (NER). *Vaccinium Myrtillus*, timolo ed estratto di *Thymus Vulgaris L.* dimostrano il loro effetto protettivo anche nei confronti del processo apoptotico, evitando l'accumulo di cellule con DNA gravemente danneggiato che potrebbero dare origine a fenomeni di mutagenesi. I dati presentati costituiscono una base di partenza per valutazioni future volte ad indagare in maniera più dettagliata il meccanismo attraverso cui l'estratto di *Vaccinium Myrtillus*, il timolo (come composto singolo) e l'estratto di *Thymus vulgaris L.* (come miscela complessa) siano in grado di svolgere la loro azione protettiva nei confronti del danno genotossico indotto da UVA e UVB. Inoltre, sarebbe interessante approfondire gli studi riguardanti la biodisponibilità e la permeabilità attraverso i tessuti dei composti in esame per un loro possibile utilizzo futuro come composti fotoprotettivi da integrare in una dieta ricca in sostanze antiossidanti (effetto sistemico) o in creme o lozioni solari (effetto topico).

## **ABSTRACT**

Sun radiation consists of several spectrum regions, depending on the wavelengths, such as ultraviolet, visible and infrared portions. The ultraviolet rays (UV) are associated with both positive and negative effects on humans' health. Ultraviolet light is used in the process of disinfection, it shows immunoregulatory activity and it stimulates vitamin D and serotonin production. It is well known that artificial sources of UVR are employed in the health field for sterilization procedures and for therapeutical purposes, such as treatment of dermatological pathologies like psoriasis, vitiligo and icterus neonatorum, as well as for aesthetic purposes (sunbed). In the last decade, besides these positive effects, UV side effects on skin have been demonstrated by different studies which correlated the intense and prolonged exposure to UV light with skin cancer development.

Based on wavelength, UV spectrum can be divided into three segments: UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm) and UVC (100-280 nm). Radiation in the UVC range, considered to be the most cytotoxic and harmful, is largely absorbed by the stratospheric ozone layer, so UV regions mainly involved in photocarcinogenesis development are considered to be ultraviolet radiation A (UVA) and ultraviolet radiation B (UVB). The amount and the UVA/UVB ratio that reach the Earth's surface is influenced by a lot of environmental factors as latitude, seasons, weather/atmospheric conditions and the time of day.

UVA is by far the most abundant solar UV radiation that reaches the Earth (about 90-95% of total UV radiation), penetrates the human epidermis down to the proliferative basal cells and even further to the derma and mediate biological events generating reactive oxygen species (ROS) in cells. ROS oxidize other cellular constituents, particularly carbohydrates, lipids, proteins and DNA. Interactions between ROS and DNA induce formation of single strand breaks (SSBs), DNA-proteins crosslink and oxidized bases. The most abundant oxidized base is the guanine that produces the 8-oxoguanine, considered as promoter of carcinogenesis.

UVB represents only 5% of total UV radiation that reaches the Earth. Besides it acts mainly at the epidermis basal layer of the skin, it is considered extremely damaging because of its high energy. UVB photons are directly absorbed by DNA and cause the formation of cyclobutane

pyrimide dimers (CPDs) and pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts (6-4PPs), which in turn can lead to apoptotic events or carcinogenesis development. Also tryptophan and tyrosine are modified by UVB inducing the alteration of structure and function of proteins. Moreover, UVB is able to produce reactive oxygen species (ROS) and reactive nitric species (RNS).

Cells have developed defense mechanisms and endogenous repair systems in order to reduce genotoxic damage UV-induced: complexes of antioxidant enzymes which take advantage of the presence of a metal to inactivate reactive oxygen species, and DNA repair systems like the base excision repair system (BER), used for oxidized bases, and the nucleotide excision repair (NER), used to repair photolesions like CPD and 6-4 PP. Recently, several molecules have been studied for their ability to give a contribution to these antioxidant defenses. For these reasons, there is a considerable interest in the concept of the use of phytochemicals and micronutrients present in the diet such as carotenoids, vitamin E and C, and polyphenols. This last group of compounds are well known for their several biological properties, such as their antioxidant activity, their ability to enhance the activity of DNA repair systems and also their skills in inflammatory and apoptotic events modulations.

Several epidemiological studies have demonstrated their biological effects and their efficiency in the prevention and treatment of several chronic diseases like cardiovascular, respiratory, neurodegenerative and inflammatory diseases and cancer.

So, in view of these reasons, the aim of my study was double: first, to confirm literature data regarding the different mechanisms used by UVA and UVB rays to cause damage in various models, then to investigate whether different plant-derivatives compounds, all belonging to the polyphenols category, were able to prevent UVA- and UVB-induced damage.

I reproduced the experiments on *in vitro* and *ex vivo* models. *In vitro* models consist of two human keratinocytes cell lines (HaCaT and NCTC 2544 cells), generally used for routine toxicological tests and photogenotoxic evaluations. Both cell lines are non tumorigenic, but showed a different degree of differentiation, higher in HaCaT cells compared to NCTC 2544. The *ex vivo* model consist of a three-dimensional model of organotypic human skin cultures useful to reproduce the physiological conditions. I tested the efficiency of three compounds: a water soluble extract of Bilberry only in the *in vitro* models (*Vaccinium Myrtillus* extract, rich in

polyphenols and considered to be the plant with the highest content of anthocyanins), a *Thymus Vulgaris* leaf extract (*Thyme* specie) and the synthetic *Thymol* (its major component), used in comparable dosages, in both models. All experimental models were pretreated in serum free medium for 1 hour with each compound and then irradiated with UVA or UVB. Control samples were treated in the same way, but not UV exposed.

In order to confirm mechanisms of UV damage and to compare results obtained in the experimental models, I performed several tests, each with a specific endpoint. I evaluated the intracellular redox status, quantifying the ROS formed and the lipid peroxidation (malondialdehyde levels, MDA), immediately after the end of UVA and UVB exposure and only in the *in vitro* models; after, I performed some genotoxic tests (the alkaline comet test to detect single and double strand breaks in single cells, the immunostaining of the histone H2AX phosphorylated to detect only double strand breaks and the micronucleous test to detect alterations to mitotic apparatus or to chromosomes); finally I investigated effects of rays on apoptotic events, using the Annexin V test and evaluating the alteration of mitochondrial membrane potential UV-induced. After, using this same assays, I tested the protective effect of *Vaccinium Myrtillus* extract, thymol and *Thymus Vulgaris L.* extract. *Vaccinium Myrtillus'* effect was evaluated only in the *in vitro* models, the protection of thymol and *Thymus Vulgaris L.* extract in both models (*in vitro* and *ex vivo*).

Results obtained confirmed the different mechanisms of action of UVA and UVB in all models. Particularly, confirming the different mechanisms of damage used by UVA and UVB rays. My results showed the more oxidant UVA effect and the more genotoxic and apoptotic UVB effect.

Three natural compounds showed their different protective effect against UVA- and UVB-induced damage, in *in vitro* models. Moreover, thymol and *Thymus Vulgaris L.* extract reduced damage UV-related both in the NCTC 2544 and HaCaT cell lines but also in the *ex vivo* model.

*Vaccinium Myrtillus* extract, thymol and *Thymus Vulgaris L.* extract reduced, to a different extent, UVA-caused damage, on account of their antioxidant properties. Compounds revealed their ability to reduce also UVB-induced damage. The efficiency against UVB damage was lower compared to the one against UVA rays. Probably the protection was related with the ability of polyphenols, and because of my compounds, to repair DNA damage UVB-induced

increasing the expression of genes involved in NER system (specifically involved in UVB-induced damage repair).

*Vaccinium Myrtillus*, thymol and *Thymus Vulgaris L.* extract showed also their protection in the apoptotic assays, avoiding the increase of extremely damaged cells which could lead to mutagenesis development.

Results obtained in my thesis activity should be considered as preliminary data useful to investigate, in detail, mechanisms used by the three natural compounds to prevent genotoxic damage UVA- and UVB-induced. Moreover, it should be very interesting to investigate the bioavailability and the permeability of tested compounds in order to use them as food supplements for a diet enriched in antioxidants (systemic effect) or in sunscreens (topical effect).

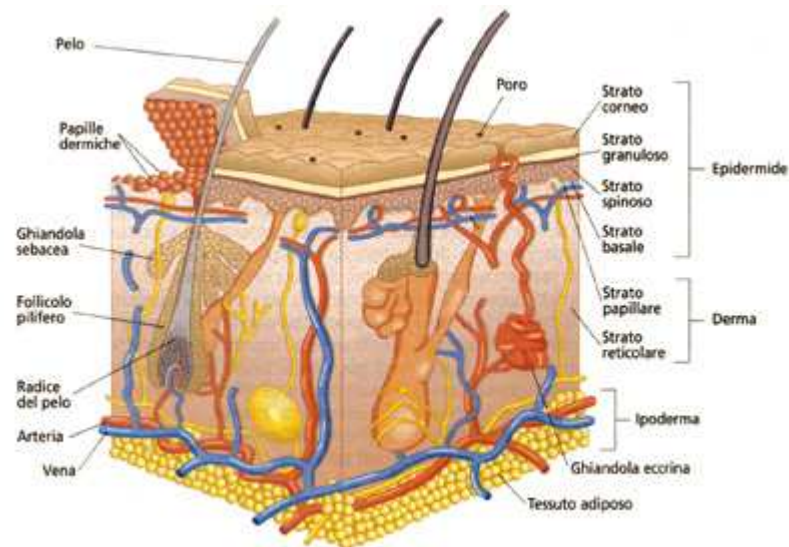
# **INTRODUZIONE**

## **1. LA PELLE**

La pelle, con una superficie che può raggiungere fino a 2 m<sup>2</sup> in un individuo di media corporatura e statura, rappresenta l'organo più esteso del corpo umano (*Nichols JA and Katiyar SK, 2010*). Ha uno spessore variabile compreso tra 0,05 e 2 mm a seconda della zona corporea. Costituisce circa il 17% del peso totale dell'individuo; riveste con continuità l'intera superficie corporea e a livello degli orifizi (apparato digerente, respiratorio e urogenitale) continua con le rispettive mucose. Presenta degli 'annessi cutanei' rappresentati dai follicoli piliferi coi peli, dalle unghie e dalle ghiandole sebacee e sudoripare.

Svolge numerose ed importanti funzioni tra cui funzioni metaboliche, detossificanti, immunologiche e termoregolative (riduce l'evaporazione dei liquidi tissutali evitando la disidratazione dell'organismo); ha, inoltre, un importante ruolo nella protezione, comunicazione e scambio. La cute infatti protegge gli organi interni da agenti chimici, fisici, meccanici e patogeni potenzialmente dannosi; raccoglie gli stimoli e mette in comunicazione l'interno del corpo umano con l'ambiente esterno grazie alle numerose terminazioni nervose in essa contenute e permette gli scambi necessari al mantenimento dell'omeostasi corporea (scambi gassosi, controllo della temperatura ed eliminazione delle sostanze dannose); partecipa all'escrezione di cataboliti e alla produzione di vitamina D. Quest'ultima, sintetizzata a seguito dell'irraggiamento ultravioletto, agisce sul metabolismo del calcio, stimolandone l'assorbimento a livello intestinale, il riassorbimento da parte dei tubuli renali e la deposizione nelle ossa. La pelle, infine, si presenta diversa in termini di spessore, colore e quantità di peli e ghiandole, innervazione e vascolarizzazione a seconda della regione corporea che ricopre (*Ambrosi et al., 2004. Anatomia dell'uomo. Edi-Ermes*).

La pelle è composta da tre strati sovrapposti: ipoderma, derma ed epidermide.



**Figura 1.** La pelle umana

Epidermide e derma sono unite da un'interfaccia irregolare sulla quale vi sono dei rilievi connettivali (*papille dermiche*) e zaffi epiteliali che ne aumentano la superficie e facilitano la comunicazione tra i due tessuti. Tra epidermide e derma vi è una complessa membrana basale costituita sia dalle cellule dell'epitelio (cheratinociti) che da quelle del derma (fibroblasti) che separa fisicamente e funzionalmente le due porzioni della pelle. La membrana basale è costituita da una *lamina basale* di microfibrille di collagene e da una *lamina lucida* attraversata da filamenti di ancoraggio e contenente glicoproteine che favoriscono l'adesione cellulare. La giunzione dermo-epidermica ha varie funzioni: fornisce supporto strutturale e funziona come filtro/barriera (blocca il passaggio di molecole con peso superiore a 40000 Dalton). Il derma aderisce alla parte sottostante mediante l'*ipoderma*, costituito da connettivo lasso ricco di adipociti. Mentre è netta la distinzione tra epidermide e derma, il connettivo del derma passa in quello dell'ipoderma senza un limite preciso.

- **Ipoderma:** è lo strato più profondo ed è composto essenzialmente da tessuto adiposo. È riccamente vascolarizzato ed innervato; costituisce un importante deposito di energia e partecipa alla termoregolazione limitando la dispersione di calore e generandone attraverso l'ossidazione dei trigliceridi.
- **Derma:** è lo strato intermedio della cute. E' suddivisibile in uno *strato papillare* (ricco di papille dermiche) a contatto con l'epidermide e in uno *strato reticolare* (ricco di fasci di fibre

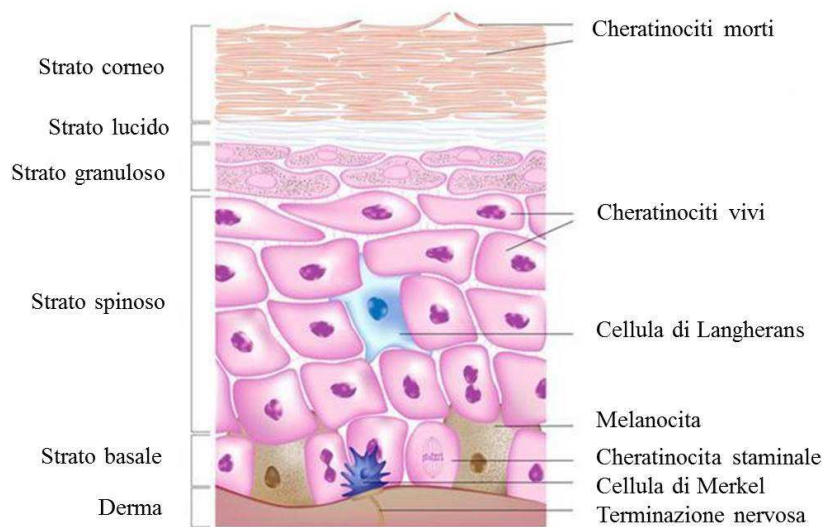


collagene e di fibre elastiche) più profondo. I fasci di fibre collagene (soprattutto di tipo I e III) che lo compongono sono piuttosto spesse, disposte in grossi fasci irregolari e intrecciati a sottili fibre elastiche, le quali formano una rete. Questi due tipi di fibre conferiscono resistenza alla trazione e proprietà elastiche. Tra le fibre si dispongono cellule quali fibroblasti, fibrociti, macrofagi, mastociti e adipociti, oltre ad elementi provenienti dal sangue (leucociti e plasmacellule) soprattutto durante i processi difensivi di tipo infiammatorio. I fibroblasti (i tipi cellulari più presenti nel derma) sono di forma affusolata o stellata e hanno un reticolo endoplasmico molto sviluppato; hanno il compito di sintetizzare tutti i tipi di fibre presenti nel derma (Colombo R et al, 2007). Il derma è composto da tessuto connettivo denso, contiene numerosissime terminazioni nervose, vasi sanguigni, ghiandole e cellule del sistema immunitario. La sua funzione è quella di fornire supporto meccanico e metabolico all'epidermide che invece manca di queste strutture.

- Epidermide: è lo strato più superficiale della pelle ed è quello in contatto con l'ambiente esterno. È un epitelio pavimentoso pluristratificato corneificato che poggia sopra una lamina di connettivo denso a fasci intrecciati (derma o corion). È composto da diversi tipi cellulari che si organizzano in cinque strati. Le cellule che costituiscono l'epidermide sono le cellule di Langerhans, le cellule di Merkel, i melanociti e i cheratinociti. I cheratinociti sono il tipo cellulare più rappresentativo dell'epidermide e hanno un ciclo vitale di circa 14 giorni. Hanno forma cubica, nucleo allungato e citoplasma basofilo. Sono così chiamati perché il loro processo differenziativo (citomorfosi cornea) è caratterizzato dall'espressione sempre crescente di cheratina (Kadaja M et al, 2014). La cheratina è una proteina composta da lunghe catene di amminoacidi che si legano tra loro tramite ponti disolfuro per creare strutture molto resistenti (la cheratina, per esempio, è il principale costituente di capelli e unghie). Nello specifico, i cheratinociti originano dalle cellule staminali della lamina basale e risalgono gli strati cutanei subendo il processo di citomorfosi cornea che prevede la sintesi e l'accumulo di  $\alpha$ -cheratina, una scleroproteina fibrosa molto resistente, in forma di tonofilamenti. A mano a mano che le cellule risalgono gli strati epidermici, la quantità di tonofilamenti aumenta progressivamente fino a rappresentare la metà del contenuto proteico cellulare mentre l'altra metà è costituita da una matrice fatta da proteine derivate dalla trasformazione dei granuli cheratoialini. I cheratinociti vanno poi incontro a morte per apoptosi e nei due strati più esterni si trasformano in lamelle di cheratina che si forma dalla combinazione di tonofilamenti

di  $\alpha$ -cheratina e matrice. La funzione principale di queste cellule è quella di proteggere l'organismo da agenti esterni quali patogeni e radiazioni UV. Il processo della citomorfosi cornea è regolato dall'interazione sia da fattori intrinseci che da fattori estrinseci quali ormoni (progesterone, estrogeni, adrenalina), prostaglandine e vitamina A. Le cellule di Merkel sono simili ai cheratinociti ma di dimensioni minori, si trovano nella zona basale vicino ad aree vascolarizzate ed innervate dal derma, e, associandosi alle terminazioni nervose afferenti, partecipano dunque alle funzioni sensoriali della cute (fungono da meccanocettori). Possono essere isolate o raggruppate in formazioni specializzate chiamate *terminazioni ederiformi* e *dischi tattili*. Le cellule di Langerhans sono cellule dendritiche che derivano da precursori emopoietici presenti nel midollo osseo e sono in grado di riconoscere, captare ed elaborare molecole ad attività antigenica per poi presentarle alle cellule immunocompetenti. I melanociti derivano dalla cresta neurale dell'embrione e conservano la capacità di dividersi con un ritmo correlato con il ricambio dei cheratinociti; sono grandi cellule dendritiche situate nello strato basale che producono melanina, un pigmento derivante dal metabolismo dell'amminoacido tirosina, che aumenta in seguito all'esposizione ai raggi solari e ha il compito di proteggere i cheratinociti (in particolare il DNA di quelli proliferanti nello strato basale) dall'azione mutagenica dei raggi ultravioletti (*Hussein MR, 2005*). Esistono due tipi di melanine nella pelle: la eumelanina di colore nero-marrone e la feomelanina rossa. I melanosomi, le vescicole contenenti melanina, una volta maturati, sono trasportati dal corpo cellulare ai dendriti e successivamente trasferiti ai cheratinociti, dove si localizzano nella zona perinucleare (*Wischermann K, 2008*). La biosintesi di melanina è influenzata da fattori ormonali (ormone ipofisario melanocito-stimolante), nutrizionali e dalle radiazioni ultraviolette. La distribuzione dei melanociti nell'epidermide è diversa da regione in regione.

Gli strati che compongono l'epidermide sono, dal basso verso l'alto, lo strato basale, lo strato spinoso, lo strato granuloso, lo strato lucido ed infine lo strato corneo



**Figura 2.** Strati dell'epidermide

- Lo *strato basale* è lo strato più profondo ed è costituito da un singolo strato di cellule che poggiano su una membrana basale alla quale sono legate mediante giunzioni ancoranti chiamate emidesmosomi. Le cellule di questo strato, che viene anche chiamato strato germinativo, sono altamente indifferenziate e in continua divisione mitotica costituendo il comparto responsabile del continuo rinnovamento cutaneo (Kadaja M et al, 2014). Queste cellule infatti in seguito a divisione asimmetrica daranno origine al tipo cellulare più rappresentativo dell'epidermide, i cheratinociti, che all'aumentare del grado di differenziazione migrano verso gli strati più superficiali (Mardaryev AN et al, 2014). In questo strato si trovano anche i melanociti e le cellule di Merkel.
  
- Lo *strato spinoso*, immediatamente sovrastante a quello germinativo, è costituito da 5-10 file di cellule poliedriche leggermente appiattite connesse tra loro da desmosomi. I tipi cellulari contenuti in questo strato sono cellule di Langerhans (prive di desmosomi) e cheratinociti che continuano il loro processo di differenziamento migrando verso gli strati superiori. La denominazione di questo strato deriva proprio dal fatto che le cellule che lo compongono hanno forme variabili ed irregolari che ricordano delle spine. Queste ultime sono ricche di melanosomi, organelli ellissoidali contenenti melanina, prodotti dai melanociti. Le cellule più superficiali di questo strato contengono, inoltre, grandi vacuoli elettrondensi chiamati cheratinosomi che aumentano di numero nello strato granuloso. I cheratinosomi contengono

una pila di lamelle lipidiche parallele che viene riversata nello spazio extracellulare formando così una barriera impermeabile all'acqua.

- Lo strato successivo a quello spinoso è rappresentato dallo *strato granuloso*. Contiene 3 o più strati di cellule costituite esclusivamente da cheratinociti. Questi cheratinociti sono notevolmente più appiattiti e differenziati di quelli dei precedenti strati tanto che iniziano ad essere degradate diverse componenti cellulari. Il citoplasma delle cellule dello strato granulare mostra al suo interno granuli di cheratoialina (contenenti filaggrina, la cui funzione è quella di aggregare le tonofibrille in fasci spessi) da cui lo strato prende il nome e che interviene nel processo di assemblaggio della cheratina.
- Lo *strato lucido* di 1-3 file di cellule appiattite e traslucide a causa della presenza di eleidina, una proteina ricca di lipidi e zolfo. Nei cheratinociti, privi di nucleo ed organuli, non sono presenti i granuli di cheratoialina mentre si trovano filamenti di cheratina impacchettati e paralleli alla superficie della cute. Le membrane cellulari sono molto ispessite. Lo strato lucido è presente solo nelle zone di cute spessa come per esempio nel palmo della mano o nella pianta del piede.
- Lo *strato corneo* è lo strato più superficiale dell'epidermide, di spessore molto variabile a seconda della sede anatomica, composto da cellule morte, completamente cheratinizzate di forma laminare. Le lamelle cornee non contengono nucleo né organelli ma solo filamenti impacchettati di cheratina e hanno membrane molto spesse. Lo spazio intercellulare è occupato dai lipidi derivanti dai cheratinosomi. Lo strato lucido è a sua volta diviso in due parti: uno strato più interno definito compatto, dove l'attività dei desmosomi tiene unite le cellule ed uno più esterno, detto disgiunto (*Ambrosi et al., 2004. Anatomia dell'uomo. Edizione Ermes*).

## 2. MODELLI SPERIMENTALI

Nell'ambiente esistono sostanze di derivazione naturale o sintetica in grado di provocare fenomeni di tossicità negli organismi viventi. Per questo motivo risulta importante valutare questa tossicità in modo da stabilire i rischi derivanti da una esposizione acuta o cronica a tali

composti. Per poter effettuare questa valutazione esistono principalmente due tipi di approccio: metodi non biologici e metodi biologici. I primi, detti anche *in silico*, fanno riferimento a simulazioni o modelli matematici che permettono di simulare, in maniera statica o dinamica, processi cellulari o fisiologici anche complessi. In questo modo cercano di ricreare il più possibile la complessità di un sistema vivente, ma rimangono metodi in grado solo di ipotizzare l'eventuale tossicità di un composto o di una sostanza in un organismo vivente. E' quindi necessario sottolineare che questi metodi possono solo integrare e non sostituire i modelli sperimentali biologici. I metodi biologici, al contrario dei precedenti, rappresentano tutte quelle applicazioni sperimentali che vengono attuate su sistemi biologici. Esistono tre grandi categorie di metodi biologici: modelli *in vivo*, modelli *in vitro* e modelli *ex vivo*.

- Modelli *in vivo*: utilizzano l'organismo vivente nella sua totalità.
- Modelli *in vitro*: si basano sull'utilizzo di una determinata parte dell'organismo vivente. In base alla porzione utilizzata si distinguono colture d'organo, colture di tessuto e colture cellulari fino ad arrivare a frazioni subcellulari come i mitocondri o i lisosomi (*Mariottini GL et al, 2010*).
- Modelli *ex vivo*: utilizzano organi o porzioni di essi isolati dall'organismo vivente e perfusi.

I modelli *in vivo* sono utili per lo studio di fenomeni fisiologici complessi relativi ad organi o sistemi nella loro interezza. Il loro impiego nella ricerca biomedica presenta diversi vantaggi come ad esempio la possibilità di valutare effetti sistemici di sostanze analizzate, di monitorare contemporaneamente più parametri biologici, di studiare in tempi brevi processi biologici complessi quali cancerogenesi, teratogenesi e comportamento ed, infine, permette di studiare i meccanismi di tossicocinetica. I limiti delle sperimentazioni *in vivo* sono però molteplici: costi elevati, necessità di strutture e processi di stabulazione adeguati, ampia variabilità biologica delle rilevazioni sperimentali, assenza di informazioni riguardanti il meccanismo d'azione a livello molecolare della sostanza esaminata.

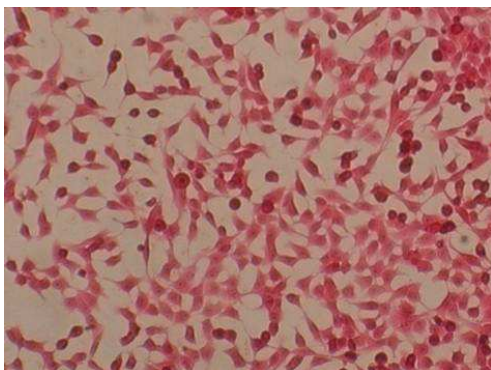
Le colture cellulari (modelli *in vitro*) costituiscono un sistema omogeneo poiché tutte le cellule contraggono identici rapporti con l'ambiente extracellulare che è il terreno di coltura; costituiscono un sistema ideale per lo studio delle funzioni cellulari e dei vari aspetti connessi con i fenomeni fisiologici e patologici conseguenti a stimoli tossici di varia natura.

Rispetto all'utilizzo di animali, i sistemi *in vitro* permettono test più economici, più veloci (e di avere quindi più replicazioni del test nello stesso periodo di tempo) e più facilmente riproducibili, grazie alla standardizzazione delle metodiche. Inoltre, permettono di creare delle manipolazioni genetiche, nonché avere delle indicazioni riguardo i meccanismi d'azione delle sostanze a livello molecolare.

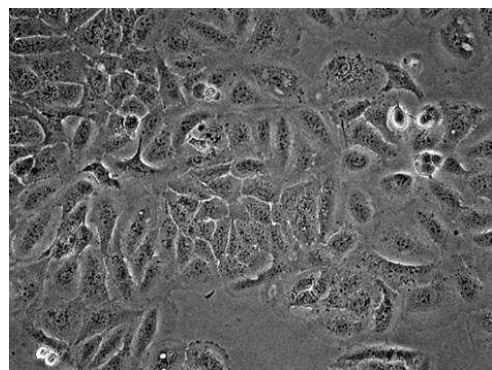
Il limite principale consiste nella differente organizzazione tra un sistema sperimentale costituito da cellule isolate tra loro e un organismo nella sua interezza e complessità funzionale e strutturale. Inoltre, i sistemi *in vitro* generalmente non riescono a fornire informazioni utili riguardo processi biologici complessi quali la tossicocinetica e il metabolismo di sostanze (es. potenziali farmaci).

Nonostante sussistano delle differenze rispetto alla situazione tipica dell'organismo, le colture cellulari possiedono caratteristiche adeguate ad una loro ampia applicazione nella ricerca biomedica (Zucco F *et al*, 1996; Mariottini GL *et al*, 2010), superando parzialmente il problema della validazione dei test per la specie umana in quanto sono numerosissime le linee cellulari umane disponibili in commercio.

Per questo studio sono state utilizzate due linee cellulari umane, spontaneamente immortalizzate, di cheratinociti: NCTC-2544 e HaCaT.



**Figura 3.** Linea cellulare NCTC-2544



**Figura 4.** Linea cellulare HaCaT

Le cellule della linea HaCaT hanno un alto grado di differenziazione, che comporta una forte cheratinizzazione della membrana plasmatica (Nogueira DR *et al*, 2011). L'altissima capacità

proliferativa è data da una mutazione a livello di entrambi gli alleli dell'oncogene p53. In seguito a danno, p53 agisce da fattore trascrizionale attivando la trascrizione di geni coinvolti nel ciclo cellulare e nell'apoptosi (Lehman TA et al, 1993). Nonostante queste due mutazioni a carico di un gene oncosoppressore, le cellule HaCaT non sono tumorali.

Le cellule NCTC-2544, invece, hanno un minor grado di differenziazione e di conseguenza una membrana meno cheratinizzata (Burlando B et al, 2008). Si tratta di una linea clonale continua, le cui cellule crescono in monostrato. Nonostante il basso stadio differenziativo presentano una buona attività enzimatica dipendente dalle proteine della famiglia del citocromo P 450 e molte delle attività metaboliche proprie dei cheratinociti differenziati, come per esempio produzione di citochine implicate nella risposta infiammatoria (Corsini E et al, 2013). Queste caratteristiche hanno portato negli ultimi anni ad un ampio utilizzo della linea NCTC 2544 come sistema biologico per la messa a punto e l'attuazione di saggi per la valutazione della fototossicità di agenti chimici (Horinouchi M and Arimoto-Kobayashi S, 2011), di allergeni da contatto (Corsini E et al, 2013) o per altri studi di tipo tossicologico (Burlando B et al, 2008).

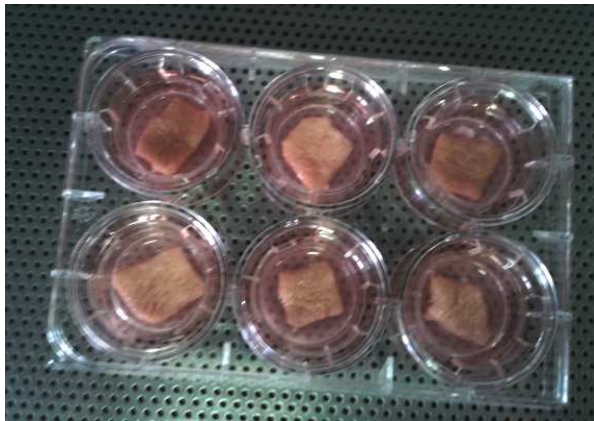
I cheratinociti umani sono diventati il centro dell'attenzione negli studi sulla pelle a causa della loro importanza nel mantenere l'integrità dello strato corneo: ecco perché entrambe le linee cellulari utilizzate in questo studio sono molto adatte a lavori di tossicologia *in vitro* (Burlando B et al, 2008).

Infatti, recentemente, è stato dimostrato che la maturazione delle cellule epidermiche *in vitro* è simile, sotto molti aspetti, alla cheratinizzazione che avviene *in vivo*. Singole cellule epidermiche in coltura formano monostrati di aspetto epiteliale grazie alla formazione di complessi desmosomi-filamenti di cheratina.

Uno studio più completo sulla risposta della cute agli agenti esterni dovrebbe includere l'utilizzo di colture di altre cellule cutanee come fibroblasti e melanociti (Burlando B et al, 2008) e co-culture di queste cellule con cheratinociti.

Un nuovo approccio per lo studio delle risposte della pelle agli agenti esterni consiste nell'utilizzo di colture organotipiche (*ex vivo*) nelle quali una parte di tessuto mantiene *in vitro* molte caratteristiche del modello *in vivo*. Gli organi perfusi (modelli *ex vivo*) rappresentano un modello sperimentale intermedio tra le colture cellulari e l'organismo intero. Essi risultano utili

quando si vogliono effettuare studi che richiedono l'integrità anatomica delle diverse parti che costituiscono l'organo in studio senza passare direttamente allo studio *in vivo*. I modelli *ex vivo* sono infatti molto utilizzati in ambito farmacologico quando si vogliono effettuare valutazioni di tossicità, efficacia e metabolismo a livello locale e indipendenti dall'interazione con altri organi, sistemi e apparati. Anatomicamente, gli organi isolati e perfusi mantengono le interazioni esistenti tra le diverse popolazioni cellulari che li costituiscono. Per queste ragioni nel mio studio sono stati condotti esperimenti anche su biopsie di cute umana provenienti da donne non fumatrici di età compresa tra i 20 e i 40 anni sottoposte ad operazioni di addominoplastica in seguito a consenso informato.



**Figura 5.** Biopsie di cute umana in Transwell

Inoltre, esistono modelli tridimensionali di pelle umana che comprendono epidermide ricostruita con uno strato corneo funzionale in grado di mimare al meglio le proprietà della pelle umana in termini di morfologia, composizione lipidica e markers biochimici. Questi modelli sono ormai validati per i test di irritazione, corrosività e fototossicità e sempre più spesso proposti come alternativa ai test condotti sugli animali (*Netzlaff F et al, 2005*). Tra questi modelli ve ne sono diversi tipi: alcuni sono costituiti da uno strato di gel che include fibroblasti e che riproduce le condizioni del derma *in vivo*, su cui si appoggia epidermide completamente differenziata e cheratinizzata (*Bernerd F et al, 1998*); altri, invece, rappresentano modelli di epidermide pigmentata contenenti cellule di Langerhans che sono utili sia per lo studio dell'iperpigmentazione che per un'analisi della risposta immunitaria causata dai raggi UV (*Duval C et al, 2003*).



### 3. LO SPETTRO ELETROMAGNETICO

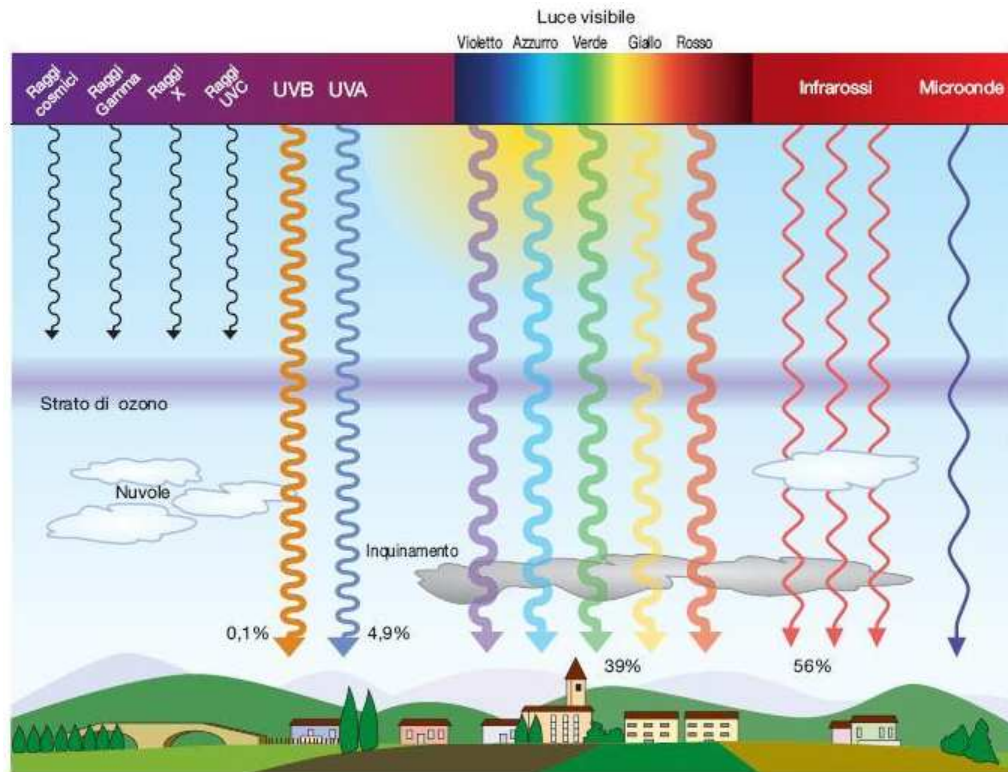


Figura 6. Lo spettro elettromagnetico

Il sole è in grado di emettere radiazioni elettromagnetiche di diverse lunghezze d'onda e frequenze. L'insieme delle lunghezze d'onda elettromagnetiche costituisce lo spettro elettromagnetico che viene suddiviso in regioni parzialmente sovrapposte.

Il Joule (J) è l'unità di misura più usata per esprimere la quantità di energia della luce. La potenza dell'irradiazione è detta irradianza e viene espressa in  $W/cm^2$ . L'energia della luce applicata alla pelle è definita dose, viene espressa in  $J/cm^2$  ed è il prodotto dell'irradianza per il tempo (Hussein MR, 2005).

La radiazione solare che raggiunge la terra è composta da raggi infrarossi, spettro del visibile e raggi ultravioletti.

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

La radiazione visibile (o semplicemente luce) ha lunghezza d'onda tra i 400 e i 780 nm. È emessa da corpi incandescenti ed è l'unica percepita dall'occhio umano.

La radiazione ultravioletta ha lunghezze d'onda comprese tra 100 e 400 nm ed è invisibile all'occhio umano (ma percepibile da alcuni insetti). È a sua volta suddivisa in tre regioni a seconda della lunghezza d'onda: UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm) e UVC (100-280 nm). Lo strato di ozono (O<sub>3</sub>) presente nella stratosfera assorbe i raggi ultravioletti, soprattutto quelli con lunghezza d'onda minore (la totalità dei raggi UVC e circa il 95% degli UVB). Alla fine degli anni Settanta è stata osservata una diminuzione lieve dei livelli generali di ozono nell'atmosfera e un calo maggiore nelle regioni polari del pianeta, che ha portato alla formazione di un "buco". Questo fenomeno, causato dall'uso eccessivo di prodotti contenenti alogeni (soprattutto cloro e bromo) che reagiscono con l'ozono trasformandolo in ossigeno molecolare, ha provocato l'aumento della quantità di raggi UVB che raggiungono la superficie terrestre (*VanLoon GW et al, 2000*).

L'esposizione moderata alla radiazione ultravioletta esercita effetti positivi sulla salute psicofisica degli individui.

Ad esempio il 7-deidrocolesterolo, presente nella membrana plasmatica dei cheratinociti e dei fibroblasti del derma, assorbe i fotoni dei raggi UVB trasformandosi in provitamina D e successivamente in vitamina D; quest'ultima, durante la trasformazione, viene rilasciata nella circolazione sanguigna e prende parte alla regolazione del metabolismo del calcio. Carenza di vitamina D, infatti, causa rachitismo nei bambini e osteoporosi e difetti nella mineralizzazione delle ossa negli adulti (*Holick MF, 2004*).

I raggi UVA sono in grado di inibire l'azione dell'enzima N-acetiltransferasi che converte la serotonina in melatonina. In questo modo si alza la concentrazione dell'ormone e neurotrasmettitore serotonina che è coinvolto nella regolazione dell'umore, dell'appetito e del ciclo sonno-veglia (*Gambichler T et al, 2002*).

Sembra, inoltre, che gli UVA inducano il rilascio di basse dosi di ossido nitrico (presente nei cheratinociti) che protegge le cellule della pelle dallo stress ossidativo e dall'apoptosi indotta da UVA (attraverso meccanismi che sono ancora oggetto di studio) e abbassa la pressione sanguigna.

Basse dosi sia di UVA che di UVB sono utilizzate per la cura di alcune patologie infiammatorie o autoimmuni della pelle come dermatiti, psoriasi e vitiligine perché hanno effetti immunosoppressivi (*Juzeniene A et al, 2012*).

Gli ultravioletti, soprattutto quelli a bassa lunghezza d'onda, vengono usati per sterilizzare acqua, aria e piani di appoggio perché formano dimeri di pirimidine che inattivano i normali meccanismi di sintesi proteica di microrganismi come batteri e virus. Sono molto utilizzati perché, al contrario della sterilizzazione chimica, non danno luogo a prodotti secondari tossici (*Moeller R et al, 2010*).

Recentemente gli studi sugli effetti dannosi dei raggi UV si sono moltiplicati perché è chiaro ormai che un'eccessiva esposizione a questo tipo di radiazioni porta alla manifestazione di fenomeni come eritemi, ustioni, fotoimmunosoppressione, fotoinvecchiamento cutaneo e fotocarcinogenesi (*Urbach F, 1989*).

Inoltre, negli ultimi anni l'incidenza dei tumori della pelle è notevolmente aumentata a causa dell'incremento dell'esposizione umana al sole (*Hussein MR, 2005*).

Oltre alla pelle, anche gli occhi sono molto colpiti dalle radiazioni ultraviolette. Gli effetti dell'esposizione acuta comprendono fotocheratite e fotocongiuntivite (risposte infiammatorie analoghe all'eritema nella cute). Una prolungata esposizione, in particolare ai raggi UVB, causa patologie come pterigio (data da una crescita anomala della congiuntiva sulla cornea) e cataratta (cioè la perdita di trasparenza del cristallino) (*Yam JC et al, 2013*).

Gli effetti dei raggi ultravioletti sulla pelle sono diversi in ogni individuo e sono relativi ai tipi di pelle, determinati perlopiù da caratteristiche genetiche. Attualmente si usa suddividere i diversi tipi di pelle in sei "fototipi". La suddivisione segue la classificazione realizzata da Thomas B. Fitzpatrick nel 1975, basata sul colore della pelle dei diversi individui e sulla loro differente risposta all'esposizione solare in termini di grado di scottatura e abbronzatura. I sei fototipi riconosciuti sono i seguenti:

**FOTOTIPO 1:** *Pelle molto chiara e facilmente soggetta a scottature solari.*

Le persone di fototipo 1 si arrossano quando si espongono al Sole e si scottano molto facilmente. Si riconoscono per i capelli biondi o rossi, la carnagione molto chiara, gli occhi chiari e la

presenza di lentiggini ed efelidi. Sono caratteristiche delle regioni nordiche. Non si abbronzano nemmeno dopo diverse esposizioni al Sole (scarsa produzione di melanina). Queste persone dovrebbero evitare l'esposizione a tutti i raggi UV.

**FOTOTIPO 2:** *Pelle chiara e soggetta a scottature solari.*

Le persone di fototipo 2 si arrossano spesso dopo l'esposizione al Sole ed è frequente che si scottino o abbiano eritemi. Hanno capelli biondi o castano chiaro, spesso lentiggini. Si abbronzano lievemente dopo alcune esposizioni.

**FOTOTIPO 3:** *Colorito medio e meno soggetti a scottature.*

È il fototipo più comune in Italia. Non è facile che si arrossi, così come che si scotti. Normalmente ha capelli biondo scuro o castani, occhi chiari o scuri. Si abbronzano visibilmente dopo qualche esposizione.

**FOTOTIPO 4:** *Colorito olivastro, poco soggetti a scottature.*

Le persone che appartengono al quarto fototipo si scottano molto di rado per la buona presenza di melanina nella pelle. Hanno capelli scuri e carnagione olivastro, oltre che occhi neri o comunque scuri. Si abbronzano facilmente ed intensamente, inoltre mantengono il colore a lungo.

**FOTOTIPO 5:** *Pelle scura, non si scottano quasi mai.*

Le persone del fototipo 5 non si scottano quasi mai. Hanno capelli neri e occhi scuri. La loro pelle è protetta naturalmente dall'esposizione solare e sono naturalmente abbronzati.

**FOTOTIPO 6:** *Pelle nera, non si scottano.*

Le persone di fototipo 6 non si scottano. Hanno i capelli neri, la pelle nera e gli occhi scuri o neri. Sono sempre abbronzati e abbondantemente protetti dalla radiazione solare. Il fototipo 6 caratterizza le persone "di colore" (Sachdeva S, 2009).

Esiste inoltre il **Fototipo 0**, che in realtà è associato all'albinismo, la malattia caratterizzata dall'assenza di melanina. Il fototipo 0 ovviamente non può esporsi alle radiazioni solari e ha molte altre restrizioni. Si riconosce per la pelle completamente bianca, i capelli bianchi e gli occhi rossi.

La sensibilità dei singoli individui alla radiazione solare è stimata mediante il MED, spesso 24 ore dopo l'esposizione alle radiazioni. Il MED è definito come la Minima Dose Eritematogena, ovvero la più bassa dose di radiazione ultravioletta in grado di causare un arrossamento appena percettibile o un arrossamento dai bordi ben definiti (Harrison GI and Young AR, 2002). Il MED

è misurato su una scala numerica che va da 0 ad infinito e nella quale la dose minima di raggi UV con i quali si ha un arrossamento è fissata a 1. E' quindi una scala che varia da persona a persona: per un fototipo 2 la MED è molto bassa, mentre si alza enormemente per un fototipo 4 o 5. Solitamente si tende a considerare che fino a 1 MED non esistono effetti collaterali all'esposizione agli UV, mentre oltre si comincia a verificare, oltre all'arrossamento, anche l'invecchiamento cutaneo, il danneggiamento degli occhi se non adeguatamente protetti e le possibili reazioni foto allergiche o fototossiche.

Diversi studi hanno dimostrato che i raggi UVB sono più efficaci per unità di dose ( $J/cm^2$ ) degli UVA di diversi ordini di grandezza nell'indurre eritema. In particolare, è noto che il MED degli UVA ( $20-80 J/cm^2$ ) è mille volte inferiore a quello degli UVB ( $20-70 mJ/cm^2$ ) (*Harrison GI and Young AR, 2002*).

### **3.1 UVA**

I raggi UVA hanno lunghezza d'onda compresa tra i 320 e i 400 nm e costituiscono circa il 95% della radiazione ultravioletta totale che raggiunge la superficie terrestre. Sono in grado di penetrare nella pelle raggiungendo il derma e quindi i melanociti (cellule molto sensibili all'azione degli UVA) ossidando la melanina presente (un pigmento che funge da filtro perché assorbe le radiazioni) (*Hussein MR, 2005*): per questo motivo gli UVA riescono a scurire immediatamente la pelle (*Wolber R et al, 2008*) e provocano invecchiamento (*Narayanapillai S et al, 2012*).

È ormai risaputo che questi raggi causano la formazione di radicali liberi dell'ossigeno cioè specie molecolari molto reattive, che sono in grado di donare o ricevere un elettrone comportandosi quindi come ossidanti o riducenti.

I radicali liberi dell'ossigeno si formano, in questo caso, dalla scissione omolitica di un legame in una molecola d'acqua, attraverso il processo di fotolisi. La loro alta reattività li porta ad avere vita media molto breve, nell'ordine dei microsecondi o meno.

I ROS si formano normalmente come sottoprodotto del metabolismo dell'ossigeno ma possono aumentare molto in situazione di stress, come l'irradiazione.

In condizioni fisiologiche partecipano a molti processi come il controllo dell'espressione genica, la trasduzione del segnale, la respirazione cellulare e l'apoptosi. Essi sono l'anione superossido  $O_2^-$ , il perossido di idrogeno  $H_2O_2$  e il radicale ossidrilico  $OH^-$  (He YY et al, 2005; Wang CC et al, 2013) e sono in grado di reagire con diversi elementi cellulari come carboidrati, DNA, proteine, e lipidi.

I ROS, interagendo con questi ultimi, portano alla lipoperossidazione degli acidi grassi polinsaturi di membrana (Punnonen K et al, 1991) causando così cambiamenti di fluidità del doppio strato fosfolipidico (Requena JR et al, 1996).

Questo processo si suddivide in tre fasi. L'inizio prevede la produzione di radicali lipidici dall'ossidazione di acidi grassi. I radicali lipidici reagiscono a loro volta con l'ossigeno molecolare formando radicali perossili lipidici, delle specie molto reattive che interagiscono con acidi grassi, originando perossidi lipidici e altri radicali lipidici. Questo ciclo termina quando due radicali lipidici reagiscono producendo una specie non radicale; ciò avviene quando la concentrazione di radicali nella cellula è molto alta (Requena JR et al, 1996).

Uno dei sottoprodotti della lipoperossidazione è la malondialdeide che è in grado di formare legami crociati tra i componenti delle membrane alterandone così le funzioni (come il trasporto e la deformabilità) e reagisce con il DNA formando addotti, precursori di fenomeni di cancerogenesi (Marnet LJ, 2000).

La doppia elica viene danneggiata, in modo indiretto, dalle specie reattive dell'ossigeno che reagiscono con gli acidi nucleici, in particolare con le pirimidine.

I principali prodotti dell'ossidazione delle basi del DNA sono la timina-glicole (derivata dall'ossidazione della timina) che si appaia erroneamente alla citosina e la 8-oxo-7,8-diidroguanina che causa una trasversione in timina e quindi un misappaiamento 8oxoG-A (Cadet J et al, 2011).

Esistono glicosilasi, specifiche e non, implicate nel processo di riparazione per escissione di basi (BER) che riconoscono queste basi modificate (che non distorcono la struttura della doppia elica) e le eliminano dal DNA lasciando un sito abasico, che viene poi processato dalla polimerasi  $\beta$  (Kim KJ et al, 2002; D'Errico M et al, 2006). Non sempre la correzione dei danni è efficace: le

rottore al singolo filamento (SSB) non riparati nella fase G1 del ciclo cellulare possono generare danni alla doppia elica (DSB) nella fase S (*Wischermann K, 2008*). Ciò può portare ad aberrazioni cromosomiche come delezioni, traslocazioni, amplificazioni (*Valko M et al, 2004*) o addirittura al blocco totale dei processi di replicazione del DNA (*Harman D, 1981*). Sembra, però, che gli UVA non siano in grado di causare DSB in maniera diretta, a causa della bassa energia dei loro fotoni (*Greinert R, 2012*).

L'8oxoG viene di solito prodotta da lunghezze d'onda di circa 350 nm; lunghezze d'onda più alte causano danni maggiori che possono portare a fenomeni di mutagenesi e cancerogenesi (*Runger TM et al, 2007*), motivo per cui gli UVA, insieme agli UVB, sono stati classificati come cancerogeni di classe I dall'Agencia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (*El Ghissassi F et al, 2009*).

Recenti studi hanno infatti dimostrato che i raggi UVA possono formare anche dimeri di pirimidine, specialmente di timine, attraverso un meccanismo diretto, che non coinvolge l'azione di radicali dell'ossigeno (*Mouret S et al, 2010*). La quantità però è molto inferiore a quella prodotta dai raggi UVB.

I ROS possono inoltre danneggiare diverse componenti del mitocondrio. L'attacco radicalico alla membrana del mitocondrio causa la perdita di potenziale e la conseguente liberazione di fattori apoptogenici come l'AIF (apoptosis inducing factor) e il citocromo c che inducono la cellula ad andare in apoptosi (*Viola G et al, 2008; Jandova J et al, 2012*).

Anche il DNA mitocondriale (mtDNA) è bersaglio dell'attività dei ROS ed è più sensibile del DNA nucleare a causa della mancanza di un sistema di riparazione e dell'assenza di proteine istoniche (*Cadenas E et al, 2000*). Le mutazioni al mtDNA possono portare alla sintesi di proteine della catena respiratoria alterate con conseguente aumento di ROS e ulteriori danni al DNA mitocondriale.

Le specie reattive dell'ossigeno possono, inoltre, reagire con le proteine. Sono in grado di provocare modificazioni reversibili o irreversibili che determinano cambiamenti strutturali e quindi funzionali che possono portare a degradazione, misfolding o aggregazione. L'eccessiva ossidazione e il conseguente cross-linking, invece, rendono le proteine resistenti alla degradazione (*Davies KJ, 1987*).

L'irradiazione UVA è coinvolta anche nel processo di infiammazione. NF- $\kappa$ B, un eterodimero implicato nel processo di infiammazione, si trova normalmente nel citosol legato alla proteina inibitoria I $\kappa$ B $\alpha$ . Gli UVA stimolano l'attività della chinasi IKK che fosforila I $\kappa$ B $\alpha$  portando alla sua degradazione nel proteasoma e quindi alla liberazione di NF- $\kappa$ B che così trasloca nel nucleo, dove agisce da fattore trascrizionale. Questo meccanismo porta alla trascrizione dei geni di proteine coinvolte nel fenomeno dell'infiammazione come citochine (IL-1, IL-6), chemochine (IL-8), molecole di adesione (ICAM, VCAM) e di proliferazione (ad esempio la ciclina D1) (Syed DN et al, 2011).

L'over-produzione di ROS altera anche l'espressione delle metalloproteinasi (MMP, coinvolte nei processi di proliferazione, migrazione, apoptosi, angiogenesi e differenziamento), delle mitogen-activated protein kinase (MAPK, che regolano la proliferazione, l'espressione genica e l'apoptosi) e delle cyclin-dependent kinase (CDK, proteine regolatrici del ciclo cellulare). Modifiche a questi pathway possono portare ad una alterata proliferazione e differenziazione delle cellule dell'epidermide e diminuzione della sintesi di collagene (a causa della up-regolazione degli enzimi di degradazione) (Baumann L, 2007).

### **3.2 UVB**

I raggi UVB possiedono una lunghezza d'onda tra i 280 e i 320 nm e sono per lo più assorbiti dallo strato di ozono: sono solo il 5% dell'irradiazione ultravioletta totale che arriva sulla Terra. Gli UVB hanno un potere penetrante minore rispetto alle radiazioni ultraviolette A: raggiungono lo strato basale dell'epidermide senza però riuscire a penetrare nel derma.

Questi raggi causano eritemi, ustioni ed abbronzatura ritardata (Wolber R et al, 2008) perché inducono l'espressione di geni coinvolti nella sintesi della melanina (Choi W et al, 2010).

Come per l'irradiazione con gli UVA, la cellula reagisce all'esposizione ai raggi UVB producendo nell'immediato specie reattive dell'ossigeno (ROS) e in tempi successivi specie reattive dell'azoto (RNS) (Terra VA et al, 2011).

NO $^-$  è considerato il RNS principale ed è prodotto a partire dall'amminoacido L-arginina, in una reazione catalizzata dall'enzima ossido nitrico sintetasi endoteliale (eNOS), costitutivamente espresso nelle cellule della pelle. In condizioni fisiologiche NO $^-$  è implicato in molti processi;



può agire, ad esempio, come regolatore del tono vascolare, come molecola segnale o antibatterica (*Didier C et al, 1999*), può inibire l'adesione e l'aggregazione piastrinica e modula l'ambiente ossidoriduttivo cellulare e la respirazione mitocondriale (*Bazzoni G et al, 2007*).

L'aumento patologico di RNS comporta diversi effetti tra cui fenomeni di infiammazione, inattivazione della catena di trasporto di elettroni mitocondriale e induzione della produzione di altri ROS e RNS. Se  $\text{NO}^\cdot$  e  $\text{O}_2^\cdot$  sono prodotti in eccesso si combinano originando  $\text{ONOO}^\cdot$ , un potente ossidante che causa perossidazione dei lipidi (*Aitken GP et al, 2007*) e rotture al DNA (*Kuchel JM et al, 2003*).  $\text{NO}^\cdot$ , inoltre, può formare stabili complessi con proteine che legano l'ossigeno molecolare (come il citocromo c ossidasi e il citocromo P450) (*Bartberger MD et al, 2002*), portando alla loro inattivazione; attiva invece le poli ADP-ribosio polimerasi, una famiglia di proteine coinvolte in diversi processi tra cui la riparazione delle rotture al singolo filamento di DNA e l'apoptosi (*Aitken GP et al, 2007*).

Avendo un'energia maggiore degli UVA, questi raggi sono più dannosi (nonostante siano in quantità minore), perché vengono direttamente assorbiti dalle basi del DNA. Si formano, in questo modo, dimeri di pirimidine (CPD), 6-4 pirimidina-pirimidone fotoprodotti (6-4 PP), citidine e dimeri citidina-timina (*Nityanand M et al, 2012*). Queste lesioni sono processate dal sistema di riparazione per escissione di nucleotidi (NER). Questo pathway prevede il taglio a monte e a valle del danno, da parte di due nucleasi, e la risintesi di DNA. Mutazioni ad uno o più enzimi del NER porta a malattie come lo xeroderma pigmentoso, che causa estrema fotosensibilità e alta insorgenza di tumori alla pelle (*D'Errico M et al, 2006*).

Basse dosi di UVB vengono tollerate dalla cellula, che riesce a riparare i danni al DNA grazie al NER; alte dosi, invece, causano lesioni così gravi da indurre la cellula ad andare in apoptosi. Sembra che la proteina oncosoppressore p53 giochi un ruolo fondamentale in questa decisione: attiva la proteina p21 che, legando e bloccando il complesso CDK-ciclina, arresta il ciclo cellulare in fase G1 per permettere la riparazione oppure induce l'azione dei geni di apoptosi (*Li G et al, 1998*).

I fotoni dei raggi UVB sono anche in grado di interagire direttamente con amminoacidi aromatici come triptofano e tirosina e in questo modo alterano la struttura delle proteine e di conseguenza anche la loro funzione (*Svobodová A et al, 2009*). Gli UVB sono inoltre in grado di indurre la

trimerizzazione del recettore CD95 anche in assenza del suo ligando attivando così il processo apoptotico in modo parallelo all'avvio dello stesso processo in seguito a danno al DNA (*Kulms D et al, 2002*).

Allo stesso modo degli UVA, anche gli UVB stimolano l'attività del fattore trascrizionale NF- $\kappa$ B, coinvolto nei fenomeni di infiammazione (*Syed DN et al, 2011*).

Esiste un enzima, la deossiribodipirimidina foto-liasi (o semplicemente fotoliasi), che è in grado di riparare il danno al DNA da irradiazione ultravioletta B. Riesce ad assorbire la luce di lunghezza d'onda a cavallo tra lo spettro del visibile e gli UVA (320-400 nm) e ne utilizza l'energia per rompere i legami covalenti dei dimeri di pirimidine. Questo processo, chiamato fotoriattivazione, è presente in batteri, funghi, piante e alcuni animali ma non negli esseri umani (*Takahashi M et al, 2011*).

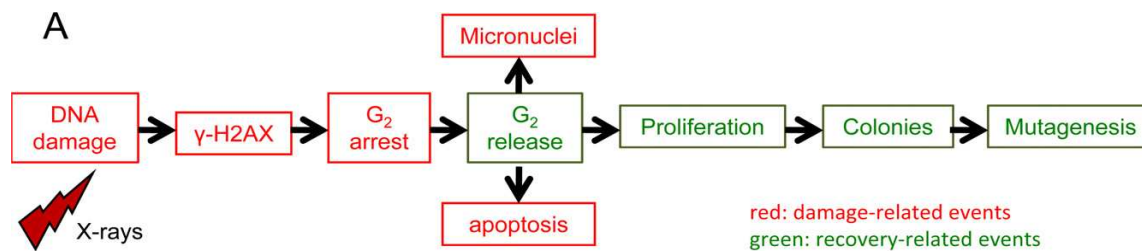
### **3.3 UVC**

Gli UVC hanno lunghezza d'onda compresa tra i 100 e i 280 nm e rappresentano una parte dello spettro elettromagnetico potenzialmente molto dannosa per la pelle. Hanno una lunghezza d'onda bassa, ma posseggono energia molto alta e sono in grado di penetrare la cute ad una profondità di 60-80  $\mu$ m. Sono altamente tossici e mutageni per le cellule perché vengono assorbiti direttamente da diverse componenti cellulari quali proteine, membrane cellulari e DNA (infatti il picco di assorbimento massimo del DNA è tra 260 e 280 nm); inoltre, come gli UVA e gli UVB, producono specie reattive dell'ossigeno. Il grosso danno causato da questi raggi spesso porta alla morte cellulare per necrosi (*Kostyuk V et al, 2008*). Vengono completamente schermati dallo strato di ozono presente nell'atmosfera, e non raggiungono la superficie terrestre; per questo motivo il loro coinvolgimento nella cancerogenesi cutanea indotta da esposizione alla luce solare non risulta rilevante (*Hussein MR, 2005*).

## **4. FOTOCANCEROGENESI**

Le cellule hanno sviluppato complessi meccanismi per il controllo della corretta proliferazione cellulare. In presenza di un danno al DNA questi meccanismi si attivano bloccando la normale progressione del ciclo per permettere alla cellula di riparare il danno o, se questo è troppo

ingente, avviare il processo apoptotico. Per il mantenimento della corretta integrità del materiale genetico la cellula può bloccare il proprio ciclo in due diversi punti: prima o durante la fase S ( $G_1/S$  checkpoint) e prima della fase M ( $G_2$  checkpoint) (Caputo F et al, 2012). Nel primo caso lo scopo è quello di evitare che eventuali errori nel materiale genetico vengano replicati e nel secondo caso, qualora il primo punto di controllo avesse fallito, per evitare che questi vengano trasmessi alle cellule figlie. Tra i differenti pathway attivati in seguito alla presenza di danno al DNA c'è quello che coinvolge una delle proteine istoniche che costituiscono i nucleosomi: H2AX il quale in caso di rottura al doppio filamento viene fosforilato dalla proteina ATM a livello della serina 139 (Rogakou EP et al., 1998). L'istone H2AX nella sua forma fosforilata ( $\gamma$ H2AX) richiama i meccanismi riparativi e rimane fosforilato fino alla completa riparazione del danno. Esistono una serie di geni deputati al controllo della corretta proliferazione cellulare distinti in tre grandi categorie: oncogeni, oncosoppressori e geni del controllo del ciclo cellulare (Hussein MR, 2005). Gli oncogeni sono geni che controllano in modo positivo la proliferazione cellulare e possono dunque essere considerati degli attivatori, i geni definiti oncosoppressori al contrario costituiscono il "freno" del ciclo cellulare, mentre i geni del controllo del ciclo cellulare comprendono tutti quei geni che codificano per le proteine come le proteine chinasi, le cicline chinasi-dipendenti, gli inibitori delle chinasi e proteine del fuso mitotico che attuano in prima persona le varie fasi del ciclo cellulare. Appare chiaro dunque che mutazioni in questi geni possono provocare una scorretta proliferazione cellulare portando ad accumulo di altre mutazioni (iniziazione tumorale) in seguito alle quali la cellula prolifera in maniera incontrollata (promozione tumorale) fino a trasformarsi in carcinoma vero e proprio (progressione tumorale) (Afaq F, 2011). L'iniziazione può avvenire anche solo dopo una singola esposizione agli UV, poiché si può avere il danneggiamento del DNA con la formazione di dimeri di pirimidina. Se il danno è riparato dai meccanismi cellulari non si avranno conseguenze; se il danno non viene riparato, i dimeri formati possono dar luogo a una mutazione che si fissa nel DNA cellulare (Galli CL et al. Tossicologia, II edizione, Piccin). Negli ultimi decenni le conoscenze sulla genotossicità delle radiazioni ultraviolette le hanno portate ad essere definite cancerogeni di Classe I dall'International Agency for the Research on Cancer (IARC) (Greinert R, 2012). In seguito a ciò numerosi studi sono stati fatti con lo scopo di cercare una correlazione tra l'insorgenza di tumori alla pelle e l'esposizione alla luce solare (Afaq F, 2011).



**Fig. 7** pathway di fotocancerogenesi in seguito ad attivazione del checkpoint di fase G<sub>2</sub>

Si distinguono tumori dell'epidermide caratterizzati da iperproliferazione di cellule squamose e basali, che gradualmente possono assumere carattere papillomatoso, con aumento di atipia cellulare. Questi tipi di carcinoma hanno un'elevata componente epiteliale. L'irradiazione con elevate dosi di UVB per brevi periodi può portare all'insorgenza di tumori dermici che interessano essenzialmente cellule fibroblastiche e, in un secondo momento, possono causare anche iperproliferazione epiteliale. Il melanoma maligno, invece, è più raro e colpisce di norma gli individui più giovani ed è più pericoloso perché tende facilmente a metastatizzare e presenta a volte una diagnosi infausta (*Galli CL et al. Tossicologia, II edizione, Piccin*).

## 5. TUMORI CUTANEI

Le principali forme di tumore della pelle si distinguono in tumori cutanei non pigmentati e tumori maligni pigmentati.

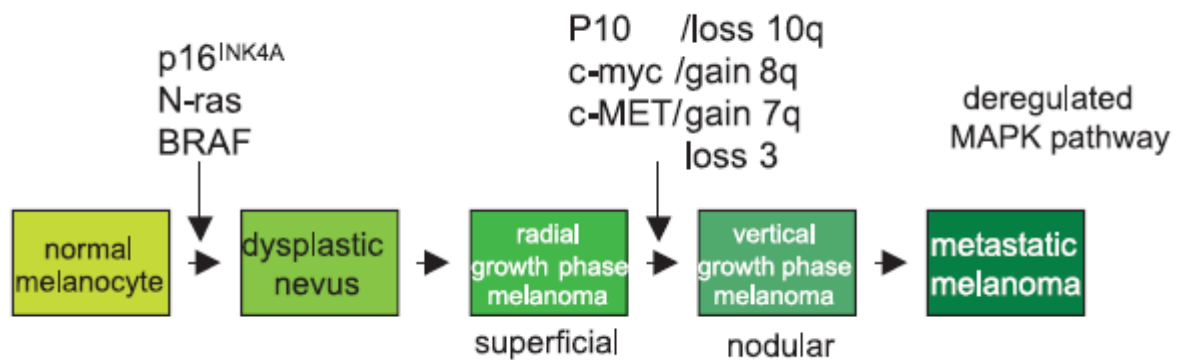
Tra i tumori cutanei non pigmentati vi sono:

- il carcinoma basocellulare (CBC): rappresenta la forma più comune e frequente (75%) dei tumori cutanei. Tumore maligno localmente aggressivo ed infiltrante, che origina dallo strato delle cellule basali dell'epidermide ma che raramente metastatizza. La superficie esterna della lesione ha il colore perlaceo e si apprezza una ricca vascolarizzazione sotto la superficie. Dal punto di vista microscopico, si possono distinguere cordoni di cellule basofile che originano da localizzazioni multiple dello strato di cellule basali e che infiltrano il derma sottostante, dove formano nidi di cellule tumorali ben organizzati. Questo tipo di tumore ha una forte

tendenza a recidivare se non si procede ad una ampia escissione della zona di cute coinvolta. Cresce nelle parti più esposte alla luce (spesso viso, labbro superiore) e la sua incidenza aumenta con l'età del paziente.

- il carcinoma a cellule squamose (CSC): insorge dai cheratinociti epidermici ed ha una bassa capacità di formare metastasi, ma più alta del CBC. Si sviluppa velocemente in aree esposte alla luce o da lesioni preesistenti, ma può anche insorgere in zone non fotoesposte. Rappresenta il 20% dei tumori cutanei, e metastatizza in altre parti del corpo. Compare spesso sul labbro inferiore, a livello del naso e delle orecchie. Può avere l'aspetto di una piccola ulcera che non cicatrizza dai bordi rilevati. Dal punto di vista istologico il tumore è ben differenziato e invade il derma.
- i linfomi: possono presentarsi come importanti manifestazioni cutanee quali macule, papule ed ulcerazioni.

Tra i tumori cutanei maligni pigmentati ricordiamo il melanoma. E' il più raro, rappresenta solo il 5% dei tumori cutanei, ma è il più pericoloso. E' un tipo di tumore che colpisce entrambi i sessi in ugual misura, prediligendo le persone con carnagione chiara, capelli rossi o biondi, occhi blu. La sua correlazione con l'esposizione agli UV è evidente, tanto che i pazienti colpiti da questo tipo di tumore presentano nella loro storia clinica ripetuti episodi di fotostione (*Galli CL et al. Tossicologia, II edizione, Piccin*). E' relativamente raro nelle popolazioni con carnagione scura. Questo tipo di tumore può originare 'de novo' dalla cute sana o da una lesione preesistente. Circa il 15% origina da nevi. La maggior parte delle varianti ha dapprima una crescita superficiale (radiale): questa è la fase in cui può essere maggiormente curato con l'escissione chirurgica. Durante questa fase i melanociti proliferano lateralmente nell'epidermide, lungo la linea di giunzione dermo-epidermica o nel derma papillare ma non metastatizzano. Col passare del tempo possono entrare in una fase di crescita verticale in cui le cellule penetrano nel derma reticolare sottostante. La comparsa di un nodulo lungo il margine laterale di una melanoma maligno costituisce un marker della crescita verticale. Vi sono quattro tipi di melanomi: il melanoma a diffusione superficiale, la lentigo maligna, il melanoma nodulare e il melanoma lentiginoso acrale (*Celotti F e Veraldi S. Patologia generale e fisiopatologia. Edises*).



**Figura 8.** Modello di progressione del melanoma

## 6. ANTIOSSIDANTI ENDOGENI

I radicali liberi sono i principali agenti lesivi delle macromolecole biologiche quali membrane cellulari, mitocondri e delle catene nucleotidiche del DNA. Accanto ai radicali dell'ossigeno (ROS), tra cui,  $O_2^-$ ,  $OH^\bullet$ ,  $H_2O_2$ , e in cooperazione con essi, possono avere un ruolo molto importante nella produzione di danni cellulari anche l'ossido di azoto e i radicali liberi (RNS) che ne derivano.

I radicali liberi dell'ossigeno sono delle specie chimicamente molto instabili, e quindi molto reattive, che possiedono un singolo elettrone non appaiato nell'orbitale esterno. Sono prodotti dalle radiazioni, dalla luce ultravioletta, ma anche dalle reazioni di ossidazione endogena durante le normali reazioni metaboliche, dal metabolismo di farmaci e da prodotti chimici esogeni (*Celotti F e Veraldi S. Patologia generale e fisiopatologia. Edises*).

I ROS sono quindi specie chimiche potenzialmente dannose. La formazione spontanea di specie reattive avviene molto lentamente ma, con la presenza di ioni metalli (Cu e Fe) che possono agire come catalizzatori, la velocità aumenta (*Galleano M et al, 2010*).

E' noto che lo stress ossidativo rappresenta una condizione patologica causata da uno sbilanciamento fra la produzione e l'eliminazione, da parte dei sistemi di difesa antiossidanti, di specie chimiche ossidanti. L'alterazione dello stato ossido-riduttivo intracellulare è stato dimostrato esser presente in diversi tipi di cellule cancerose rispetto alle cellule normali; questo sbilanciamento si pensa sia correlato con la stimolazione oncogenica. L'insorgenza di una mutazione nel DNA è considerato uno step importante nella cancerogenesi; elevati livelli di

lesioni ossidative al DNA (8-OH-G) sono stati riscontrati in varie tipologie di tumore, considerando questo tipo di lesione come una di quelle maggiormente implicate nell'insorgenza del cancro. Inoltre, sembra che il danno al DNA sia particolarmente legato al processo di iniziazione della carcinogenesi (Valko M et al, 2006).

Per questo motivo gli organismi hanno sviluppato un sistema di difesa antiossidante che può essere suddiviso in diverse classi:

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

I sistemi enzimatici principalmente coinvolti sono la superossido dismutasi (SOD), la catalasi (CAT) e la glutatione perossidasi (GPx). Tutti questi enzimi sfruttano la presenza dello ione di un metallo di transizione redox-attivo.

In condizioni ideali la SOD, la CAT e la GPx agiscono in maniera ordinata e sequenziale potenziandosi nel loro importante ruolo di antiossidanti. Tuttavia, questi sistemi di protezione non possono impedire l'instaurarsi del danno cellulare, quando la formazione dei radicali supera le loro capacità tampone o quando i sistemi di protezione sono inefficaci (Celotti F e Veraldi S. *Patologia generale e fisiopatologia. Edises*).

## **6.1 SUPEROSSIDO DISMUTASI (SOD)**

Questo metalloenzima agisce sullo ione superossido ( $O_2^-$ ) e costituisce il primo sistema di difesa contro i danni causati da radicali dell'ossigeno; per questo motivo è un enzima essenziale per tutti gli organismi aerobi.

Esistono 3 isoforme (con un alto grado di omologia) ognuna delle quali è legata ad un metallo diverso: CuZn-SOD (legata uno ione rame e uno ione zinco), Mn-SOD (legata ad uno ione manganese) e Fe-SOD (unita ad uno ione ferro).

La CuZn-SOD è una proteina dimerica di 32 KDa presente nel citoplasma; recentemente è stata individuata anche nei lisosomi, nei perossisomi e nello spazio intermembrana dei mitocondri. La CuZn-SOD accelera la reazione di dismutazione dell' $O_2^-$  producendo  $O_2$  e  $H_2O_2$ .

La Mn-SOD ha peso molecolare di 40KDa, assume forma dimerica o tetramerica e si trova nella matrice mitocondriale.

La Fe-SOD, di forma dimerica o tetramerica, è presente nel citosol e nei mitocondri.

Si ritiene che l'apparizione della SOD sia avvenuta in contemporanea con la nascita degli organismi fotosintetici, i quali sono in grado di produrre ossigeno (*Hermes-Lima M et al, 2004*).

## **6.2 CATALASI (CAT)**

La catalasi, una proteina di 240 KDa molto conservata nel corso dell'evoluzione, è presente nei perossisomi ed ha la funzione di inattivare il perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ), portando alla formazione di acqua e ossigeno. Questo enzima è formato da 4 subunità identiche, ciascuna delle quali contiene un gruppo eme ed una molecola di NADPH ed è attivata da elevate concentrazioni di perossido di idrogeno; dovendo operare con molecole molto reattive, è anch'esso particolarmente instabile. È uno dei più attivi catalizzatori biologici conosciuti, infatti è capace di convertire milioni di molecole di  $H_2O_2$  al secondo (*Hermes-Lima M et al, 2004*).

## **6.3 GLUTATIONE PEROSSIDASI (GPx)**

La glutatione perossidasi è un enzima selenio dipendente, presente nel citosol e nei mitocondri, formato da 4 subunità in grado di inattivare il perossido di idrogeno e altri perossidi (attraverso un complesso ciclo di reazioni) portando rispettivamente alla formazione di acqua e alcoli. Ne esistono 5 isoforme (GPx-1/GPx-5), tra cui la classica cGPx di 76-105 KDa, che differiscono per localizzazione cellulare e tissutale. La sua concentrazione intracellulare aumenta notevolmente in presenza di alti livelli di perossidi. Le GPx sono in grado di metabolizzare i perossidi organici come i perossidi lipidici derivati dal processo di lipoperossidazione (*Hermes-Lima M et al, 2004*).

Esistono anche antiossidanti endogeni non enzimatici:

-le proteine SH che agiscono principalmente nel plasma e sono in grado di donare un elettrone a molecole reattive, trasformandole così in composti stabili;



-le proteine leganti Cu e Fe (come transferrina e ceruloplasmina);

-la bilirubina che è un prodotto del metabolismo dell'emoglobina e agisce sui radicali perossilici nel plasma, ma è presente in basse quantità perché altrimenti comporta danni cerebrali e itterizia;

-l'acido urico, un prodotto del catabolismo delle purine, il quale esplica la sua funzione nel sistema nervoso e nel tratto respiratorio agendo sui radicali idrossile e perossi-nitrito e riducendo l'ozono (*Hermes-Lima M et al, 2004*).

## **7. ANTIOSSIDANTI ESOGENI**

Esistono in natura sostanze che sono in grado di reagire con i radicali liberi. Queste sostanze possono essere di due tipi:

-gli scavenger, agenti che riducono la concentrazione di radicali liberi grazie alla loro capacità di reagire con essi, ossidandosi a loro volta;

-i chainbreaker che sono capaci di bloccare la propagazione delle reazioni radicaliche a catena.

Questi antiossidanti sono molto presenti in frutti e vegetali e sono suddivisi in tre categorie: vitamine, carotenoidi e polifenoli.

### **7.1 VITAMINE**

Tra le vitamine, quelle con il maggiore potere antiossidante sono la vitamina C (di tipo idrosolubile) e la vitamina E (di tipo liposolubile).

La vitamina C o acido ascorbico è un potentissimo riducente ed in presenza di ossigeno e metalli tende ad ossidarsi formando acido L-deidroascorbico ed acqua ossigenata.

È presente in moltissimi frutti, soprattutto negli agrumi e in verdure a foglia verde come broccoli, cavolfiori e cavoli. È in grado di reagire sia con le specie reattive dell'ossigeno che con i radicali dell'azoto. La vitamina C deve essere assunta con la dieta perché l'organismo umano non è in grado di produrla da sola.

Questa molecola prende parte a molti processi tra cui la sintesi di collagene, dentina, ormoni steroidei e catecolamine (è coinvolto nella conversione della dopamina in adrenalina). E' indispensabile per la guarigione delle ferite (*Naidu KA, 2003*).

La mancanza di vitamina C causa lo scorbuto, patologia che comporta alterazioni a livello dei vasi sanguigni con conseguenti emorragie (che possono portare ad anemia sideropenica), gengiviti e rallentamento della cicatrizzazione delle ferite.

La vitamina E, detta anche tocoferolo, è in grado di prevenire l'ossidazione degli acidi grassi di membrana, evento chiave nello sviluppo del processo di lipoperossidazione. La vitamina E è in grado di donare un atomo di idrogeno ai radicali perossili lipidici, rendendoli meno reattivi. Studi recenti hanno proposto anche una sua attività di regolatore genico (*Azzi et al, 2002*).

Sono ricchi di vitamine E alimenti come grano, noci, nocciole, mandorle, olii vegetali e verdure a foglia verde (*Hermes-Lima M et al, 2004*).

## **7.2 CAROTENOIDI**

Sono una classe di oltre 600 pigmenti presenti in piante e batteri ma non negli animali. Sono suddivisi in due classi: i caroteni, che sono privi di ossigeno, e le xantofille, che invece contengono ossigeno. Sono pigmenti accessori che assorbono luce ad una lunghezza d'onda diversa rispetto alla clorofilla, infatti hanno un colore giallo-rosso.

Negli organismi fotosintetici prendono parte alla catena di trasporto dell'energia e proteggono il centro di reazione dei fotosistemi, coinvolti nel processo di fotosintesi.

Nell'uomo (che deve assumerli con la dieta) hanno un importante ruolo di antiossidanti (che varia a seconda della loro struttura): agiscono contro  $O_2^-$  e  $H_2O_2$ .

I carotenoidi, invece di generare altre reazioni chimiche, dissipano l'energia rilasciandola nel mezzo in cui si trovano e sono quindi subito disponibili per agire su altri radicali liberi (*Sies H et al, 1995*). Negli organismi umani i caroteni sono precursori della vitamina A (sono definiti, infatti, provitamina A), molto importante per la vista, la crescita ossea e lo sviluppo embrionale (*Zile MH, 1998*).

### **7.3 POLIFENOLI**

I polifenoli sono una famiglia di oltre 5000 molecole organiche derivate dal metabolismo secondario delle piante. Sono ubiquitari e fondamentali nella pianta: sono molecole segnale per la maturazione e la crescita, danno resistenza contro i patogeni e gli insetti e sono la causa di pigmentazione e caratteristiche organolettiche. Contribuiscono, inoltre, alla protezione contro la continua esposizione delle piante ai raggi solari, in particolare ai raggi UV. Sono presenti soprattutto nel tessuto delle foglie, nella corteccia, nei fiori e nei frutti.

Come indica il nome, sono caratterizzati dalla presenza di gruppi fenolici associati in strutture più o meno complesse ad alto peso molecolare.

Vengono classificati in diverse categorie.

#### **7.3.1 Acidi fenolici**

Detti anche fenoli semplici, sono caratterizzati da un solo anello benzenico e sono presenti soprattutto negli olii essenziali come il timolo, nella frutta secca e nei funghi. Siccome sono presenti solo in pochi prodotti consumati dall'uomo, non sono molto studiati. Sono a loro volta suddivisi in acidi idrossibenzoici e acidi idrossicinnamici (*Manach C et al, 2004*).

#### **7.3.2 Lignani**

Presenti nei cereali, nei semi di lino e di sesamo, sono chiamati anche fitoestrogeni per le loro proprietà ormonali di tipo estrogenico. Proteggono le piante dall'aggressione dei microrganismi (*Manach C et al, 2004*).

#### **7.3.3 Stilbeni**

Presenti soprattutto nei tessuti legnosi e carnosì della pianta, sono prodotti in risposta a stress. Per questo motivo sono inclusi in una classe di antibiotici vegetali denominati fitoalessine. Tra questi, il più importante e conosciuto è il resveratrolo, un composto sintetizzato in risposta a stress ambientali (come l'irradiazione UV) o attacchi patogeni che possiede attività antiossidanti e anticancerogene. È presente soprattutto nella buccia degli acini d'uva e quindi nel vino rosso. È in grado di inibire la perossidazione lipidica, è un vasoprotettore e inibitore dell'aggregazione piastrinica perché diminuisce l'attività delle ciclossigenasi COX-1 e COX-2 (enzimi coinvolti nel processo di infiammazione) e aumenta la produzione dell'enzima ossido nitrico sintetasi. Come antinfiammatorio è in grado di bloccare il fattore trascrizionale NF-κB, una proteina che

gioca un ruolo chiave nella regolazione della risposta immunitaria (*Bhat KP et al, 2002*). L'effetto antitumorale è dato dalla sua capacità di indurre apoptosi aumentando l'attività delle caspasi (molecole che portano all'apoptosi) e diminuendo il livelli di Bcl-2 e Bcl-xL (proteine antiapoptotiche) (*Kim YA et al, 2004*).

#### **7.3.4 Flavonoidi**

Composti fenolici idrosolubili costituiti da 2 anelli aromatici (chiamati A e B) collegati da tre atomi di carbonio che spesso formano un anello eterociclico (anello C) (*Galleano M et al, 2010*).

Presenti in tutta la pianta soprattutto in frutti e petali dei fiori, donano particolari colorazioni gialle o rosso-blu che attirano gli insetti impollinatori.

Sono molto presenti in prezzemolo, cipolle, banane, agrumi, ginkgo biloba, cioccolato fondente, bacche (ad esempio i mirtilli) e in bevande quali the verde, the nero e vino rosso.

Sono coinvolti nella fissazione dell'azoto e nella protezione contro gli UV. Possono agire anche come messaggeri chimici, regolatori del metabolismo (interagendo con proteine di membrana, recettori e trasportatori) e dell'espressione genica. Sono in grado di inibire l'attività di molti enzimi tra cui (*Cao G et al, 1996*):

-la lipossigenasi e la ciclossigenasi, coinvolte nei fenomeni infiammatori e nella formazione delle placche aterosclerotiche perché stimolano l'aggregazione piastrinica (la lipossigenasi, nel regno vegetale, è coinvolta nella sintesi di molecole regolatrici implicate nella risposta a stress fisici e ferite);

-la xantina ossidasi che ossida l'ipoxantina ad acido urico producendo anione superossido;

-la fosfolipasi A che catalizza la reazione di idrolisi dei fosfolipidi ed è implicata in diversi processi infiammatori in malattie cardiovascolari, neurodegenerative e respiratorie;

-le serina/treonina protein chinasi (come MAPK) che sono implicate in moltissimi processi cellulari, in particolare ERK1/2 stimolata da fattori di crescita e p38 attivata da stress ed infiammazione.

Sono precursori di sostanze tossiche e sono inoltre coinvolti nella fotosintesi e nel trasferimento di energia.

Le proprietà antiradicaliche dei flavonoidi sono molteplici e dipendono dalla loro struttura, polarità e solubilità: le forme glicosilate sono meno potenti dei rispettivi agliconi (*Kahkonen MP et al, 2003*) e maggiore è il grado di polimerizzazione più alta è la capacità antiossidante (*Ross JA et al, 2002*).

Agiscono come agenti riducenti di specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto (inibendo direttamente la loro formazione o le reazioni di propagazione) e come quencher di ossigeno singoletto (*Van Acker S et al, 1995*).

Inoltre, legano con alta affinità gli ioni metallici (che catalizzano molti processi che conducono alla formazione di radicali liberi) e li chelano (*Saija A et al, 1994*).

Sono capaci anche di inibire o ritardare la lipoperossidazione donando un atomo di idrogeno ai radicali perossili lipidici e interrompendo così la propagazione della reazione a catena (*Galleano M et al, 2010*).

Molti studi epidemiologici hanno confermato che il consumo di flavonoidi comporta la diminuzione del rischio associato a malattie cardiovascolari e cerebrovascolari, alcuni tipi di tumore e malattie neurodegenerative.

Alzheimer e Parkinson sono patologie causate da molteplici eventi quali neuroinfiammazione, aumento dello stress ossidativo ed esaurimento dell'attività antiossidante endogena (*Vauzour D et al, 2010*).

I flavonoidi aumentano le funzioni dei neuroni e stimolano la loro rigenerazione riducendo la quantità di radicali liberi.

La cascata del segnale della proteina MAPK (mitogen-activated protein kinase) gioca un ruolo importante nella mediazione dell'infiammazione nelle cellule del sistema nervoso. I pathway di alcune MAPK come ERK1/2 e p38 regolano l'espressione di iNOS (la forma inducibile della sintetasi dell'ossido nitrico) e quindi il conseguente aumento di NO<sup>-</sup> (*Vauzour D et al, 2010*). È stato dimostrato che i flavonoidi sono in grado di raggiungere il cervello (*El Mohsen MA, 2006*) e modulare l'attività di queste proteine attenuando la risposta infiammatoria nelle cellule gliali (*Vafeiadou K et al, 2009*).

Altre ricerche stanno analizzando l'impatto di queste sostanze su aspetti cognitivi come la memoria e la depressione (*Spencer JP, 2008*).

Come per le cellule neuronali, anche nel caso delle cellule endoteliali dei vasi sanguigni i flavonoidi modulano l'attività della sintetasi dell'ossido nitrico (eNOS): questo porta all'aumento della produzione di NO<sup>-</sup>, un potente vasodilatatore e inibitore dell'adesione e aggregazione piastrinica (*Appeldorn MM et al, 2009*).

L'assunzione di alimenti contenenti flavonoidi aumenta la resistenza delle lipoproteine a bassa densità (LDL) all'ossidazione da parte di macrofagi e alza la concentrazione di lipoproteine ad alta densità (HDL) nel plasma (*Baba S et al, 2007*): in questo modo si riduce enormemente la formazione di placche aterosclerotiche che possono portare a patologie del sistema cardiovascolare come l'infarto.

I flavonoidi sono inoltre in grado di inibire la traslocazione nucleare della proteina NF-kB (un fattore trascrizionale che induce la trascrizione di geni coinvolti nel fenomeno dell'infiammazione, dell'angiogenesi e della proliferazione cellulare) inibendo l'attività della chinasi IKK (la quale fosforila e così inattiva gli inibitori di NF-kB) (*Wheeler DS et al, 2004*).

Sono anche in grado di aumentare l'attività di enzimi antiossidanti endogeni come CAT e CuZn-SOD (*Shan Q et al, 2009*).

I flavonoidi sono implicati anche nella cancerogenesi e nello sviluppo del tumore. Si è visto che questi composti portano ad un drastico cambiamento dei livelli di mRNA di geni coinvolti nel ciclo cellulare e nell'apoptosi: inducono l'espressione di p21 e p27 (proteine che bloccano la progressione del ciclo cellulare) mentre inibiscono la produzione della ciclina D<sub>1</sub> e la fosforilazione del retinoblastoma (eventi che conducono all'avanzamento del ciclo) (*Khan N et al, 2006*).

Stimolano l'apoptosi legandosi e così inattivando le proteine antiapoptotiche Bcl-2 e Bcl-xL (*Lambert JD et al, 2005*); attivano la caspasi 3 (proteina esecutrice dell'apoptosi) e promuovono la depolarizzazione della membrana del mitocondrio, facilitando così il rilascio del citocromo c (evento chiave del fenomeno della morte cellulare programmata) (*Khan N et al, 2006*).

Inibendo l'attività della DNA topoisomerasi II non permettono la riparazione di danni alla doppia elica e in questo modo stimolano l'entrata della cellula in apoptosi (*Ross JA et al, 2002*).

Aumentano l'espressione di geni come XP-A e XP-C che sono coinvolti nella riparazione per escissione di nucleotidi (NER), processo che corregge grosse lesioni a carico del DNA (come fotoprodotto indotti da radiazione ultravioletta) (*Katiyar SK et al, 2011*).

Anche il processo di metastatizzazione viene inibito: infatti i composti fenolici riducono la secrezione della proteina VEGF (vascular endothelial growth factor) coinvolta nel processo di angiogenesi tumorale (*Wang KL et al, 2013*) e bloccano direttamente ed indirettamente l'attività delle metalloproteinasi MMP-2 e MMP-9 implicate nel rimodellamento tissutale associato al processo di angiogenesi (*Fassina G et al, 2004*).

La diversa disposizione dei gruppi idrossili e carbossili e dei doppi legami definiscono i sottogruppi di flavonoidi (*Galleano M et al, 2010*).

Flavonoli: si trovano coniugati a residui di zucchero, principalmente glucosio e ramnosio, ma anche galattosio, arabinosio e xilosio. I più diffusi sono la quercetina (che è uno degli scavenger più efficienti, soprattutto se non glicosilata) e la miricetina (*Dugas AJ Jr et al, 2000*). Spesso si accumulano nei tessuti esterni delle piante (epidermide e foglie) perché la loro biosintesi è stimolata dalla luce. Sono molto presenti in cipolle, porri e broccoli (*Manach C et al, 2004*).

Flavoni: sono meno comuni dei flavonoli (ai quali assomigliano molto) e sono presenti principalmente in forma glicosilata. Si trovano nel prezzemolo, nel sedano e nella buccia degli agrumi.

Isoflavoni: sono incolori e hanno una distribuzione limitata alle sole Leguminosae e Iridaceae. La soia è la principale fonte di isoflavoni nella dieta umana. Hanno una struttura simile all'estrogeno e ciò conferisce loro proprietà pseudo ormonali come la capacità di legare il recettore degli estrogeni (*Manach C et al, 2004*). I principali sono la genisteina e la daidzeina. Sembra che questi composti abbiano effetti benefici contro malattie cardiovascolari, osteoporosi e cancro oltre ad avere proprietà antiossidanti e di modulazione della proliferazione cellulare (*Marin FR et al, 2005*).

Flavanoli: esistono sia in forma monomerica (catechine) che polimerica (proantocianidine). Le catechine (che sono i precursori delle forme polimeriche) sono presenti in molti frutti, soprattutto nelle albicocche, e in bevande come vino rosso e the verde. Altre forme monomeriche come gallo catechine ed epigallo catechine si trovano soprattutto in semi di leguminose e uva. Le proantocianidine sono le responsabili della proprietà astringente di molti frutti quali uva, pesche, mele e pere e del gusto amaro del cioccolato. È difficile stimare la loro concentrazione negli alimenti perché hanno strutture e pesi molecolari molto diversi tra di loro (*Manach C et al, 2004*).

Antocianine: sono oltre 500 pigmenti idrosolubili presenti nei tessuti epidermici di fiori e frutti, a cui donano una colorazione rosso-blu. Esistono in diverse forme chimiche che assumono differenti colori a seconda del pH della soluzione in cui si trovano. Sono stabili e di colore blu a  $\text{pH} < 3$  ma a pH più alti (come quelli presenti nelle colture cellulari) hanno stabilità ridotta e sono incolori (*Halliwel B, 2007a; Woodward G et al, 2009*).

Sono la forma glicosilata delle antocianidine (che sono composti molto instabili). Il legame di uno zucchero, specialmente il glucosio (ma anche galattosio, xilosio, arabinosio e ramnosio), previene la degradazione. Le antocianine sono stabilizzate dalla formazione di complessi con altri flavonoidi (copigmentazione).

Hanno capacità antimicrobiche e antiossidanti nei tessuti delle piante e grazie al loro colore attraggono animali e insetti per l'impollinazione (*Kong JM et al, 2003*).

Sono molto presenti in vino rosso, alcune varietà di cereali, cipolle, radicchio, melanzane e fagioli. Esistono 17 antocianidine in natura ma solo sei sono di importanza alimentare: cianidina, delphinidina, petunidina, peonidina, pelargonidina e malvidina. La cianidina è l'antocianidina più comune ed è abbondante soprattutto nelle bacche di mirtillo, mora e sambuco (*Manach C et al, 2004*).

Diversamente dagli altri flavonoidi, le antocianine sono assorbite ed escrete integre, senza che venga rimosso lo zucchero legato. L'assorbimento avviene subito dopo l'ingestione, probabilmente nello stomaco; la concentrazione plasmatica maggiore è raggiunta dopo 15-60 minuti mentre l'escrezione totale con le urine avviene dopo 6-8 ore (*McGhie TK et al, 2007*).



Tutti gli studi effettuati confermano la bassa biodisponibilità di questi composti, spesso minore dello 0,1% della dose ingerita.

Studi epidemiologici hanno dimostrato che il consumo di alimenti ricchi di antocianine diminuiscono il rischio di malattie cardiovascolari, diabete, artrite e cancro grazie alle loro proprietà antiossidanti, antinfiammatorie, antiproliferative, antiaggreganti, proapoptotiche e antimicrobiche (*Wang LS et al, 2008*).

Alcuni studi sostengono che le sostanze antiossidanti sopra elencate, ad alte dosi, possano assumere caratteristiche proossidanti (*Halliwel B, 2007b*).

L'acido ascorbico, in presenza di  $H_2O_2$ , aumenta l'attività nucleasica della 1,10-fenantrolina (*Burkitt MJ et al, 1996*); le delfinidine, invece, mobilizzano ioni rame nucleari, stimolando così il loro legame con la 1,10-fenantrolina che causa frammentazione del DNA, in presenza di radicali liberi (*Hanif S et al, 2008*).

## 8. VACCINIUM MYRTILLUS

Il genere *Vaccinium* conta circa 450 specie appartenenti alla famiglia delle Ericaceae. Sono piante sempreverdi che si sviluppano in luoghi semiombreggianti e che producono un particolare frutto che è il mirtillo. Le bacche prodotte da queste specie contengono molti fitonutrienti, in particolare flavonoidi, che donano a questi frutti un'altissima capacità antiossidante.

Il *Vaccinium Myrtillus* è la specie che contiene la maggior quantità di antocianine (*Koponen JM, 2007*).



**Figura 9.** *Vaccinium Myrtillus*

Il *Vaccinium Myrtillus* (detto anche mirtillo selvatico europeo) è un piccolo cespuglio nativo del nord Europa ma presente anche in nord America e Asia. Di solito cresce in lande, prati o umide foreste di conifere e il suo sviluppo è favorito da condizioni di moderata ombreggiatura e umidità del suolo.

Il mirtillo è un piccolo frutto di diametro compreso tra i 5 e i 9 millimetri di colore blu-nero e con molti semi.

Questa specie di mirtillo contiene una varietà di composti fenolici come flavanoli (quercetina e catechine), tannini, acidi fenolici ma soprattutto antocianine (Seeram NP, 2008): è inoltre la varietà che ha il più alto contenuto di antocianine paragonato ad altri frutti come fragole, lamponi, sambuco e mirtillo rosso. Il contenuto totale di antocianine è di 300-700 mg/100 g di prodotto fresco e varia a seconda delle condizioni di coltivazione (come luce, umidità e temperatura), di crescita e di grado di maturazione (più la bacca è matura minore è la loro concentrazione). Le antocianine sono presenti soprattutto nella buccia del frutto.

Nonostante la maggior parte dell'attenzione si focalizzi sulle sue proprietà antiossidanti, l'azione del mirtillo riguarda anche pathway di segnale cellulare, espressione genica, riparo del DNA, adesione cellulare ed effetti antineoplastici e antimicrobici (Seeram NP, 2008).

Essendo ricco di antociani, il mirtillo è un frutto con altissime capacità antiossidanti.

*In vitro* questa capacità è stata ben vista: gli antociani sono in grado, ad esempio, di inibire la lipoperossidazione e rimuovere i radicali idrossilici (Laplaud PM et al, 1997).

Anche studi su animali confermano l'attività antiossidante del mirtillo (Kolossova NG et al, 2006; Lala G et al, 2006) e solo recentemente sono stati visti effetti anche nell'uomo (Karlsen A et al, 2010; Kolehmainen M et al, 2012).

Nell'uomo, però, non è sempre stato possibile correlare il consumo di polifenoli con una diminuzione dello stress ossidativo (Boyle SP et al, 2000). Questi risultati discordanti sono dovuti all'eterogeneità di questi composti, alle loro caratteristiche strutturali e funzionali e da come vengono assorbiti e metabolizzati dall'apparato gastroenterico.

Nel tratto gastrico la concentrazione di polifenoli è simile a quella contenuta negli alimenti mentre quella disponibile nei distretti corporei è minore a causa dei processi di trasformazione (Rice-Evans C, 2004). La trasformazione diminuisce la capacità antiossidante dei polifenoli perché le modifiche avvengono proprio a carico dei gruppi responsabili dell'attività antiossidante: questo processo serve a limitare gli eventuali effetti tossici e a facilitare l'escrezione (Rechner AR et al, 2002).

In particolare gli antociani tendono ad assumere forme chimiche diverse a seconda del pH della soluzione: a pH superiori a 7 tendono ad essere degradati. Poiché gli studi su campioni umani devono essere condotti a pH neutro per mantenere la vitalità cellulare, in queste condizioni gli antociani sono molto difficili da misurare.

Tra le cause maggiori delle patologie a carico del sistema cardiovascolare c'è l'aterosclerosi, un processo infiammatorio associato a stress ossidativo a carico dell'endotelio vascolare. Studi *in vivo* sull'uomo hanno riscontrato effetti cardioprotettivi del mirtillo come inibizione dell'aggregazione piastrinica, aumento del colesterolo HDL e abbassamento della pressione sistolica (Erlund I et al, 2008).

In modelli animali si è visto che le antocianine proteggono dal danno da riperfusione dopo ischemia (che provoca generazione di ROS, induzione di apoptosi e necrosi e danni da infiammazione con reclutamento di cellule infiammatorie) attenuando l'adesione leucocitaria e migliorando la riperfusione del sangue (Bertuglia S et al, 1995).

*In vitro* inibiscono l'elastasi, un enzima proteolitico coinvolto nella degradazione del collagene e di altri componenti della matrice extravascolare coinvolti in alcune patologie come l'aterosclerosi.

Molti studi hanno confermato che gli antociani hanno effetti antinfiammatori perché inibiscono l'attivazione di NF-kB (Karlsen A et al, 2007) e l'attività del proteasoma, che ha il compito di degradare le proteine cellulari (Dreiseitel A et al, 2008).

La somministrazione di Medox (un prodotto commerciale di antocianine purificate da mirtillo) a soggetti sani per 3 settimane ha causato la diminuzione di citochine immunoregolatriche e di chemochine proinfiammatorie regolate da NF-kB (Karlsen A et al, 2007).

Uno studio su cellule epiteliali umane di colon ha mostrato l'efficacia del mirtillo nel diminuire l'espressione e la secrezione di mediatori proinfiammatori quali tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ) e interferon gamma-induced protein 10 (IP-10) (*Triebel S et al, 2012*).

Si sono visti anche effetti ipoglicemici soprattutto nel diabete di tipo II, patologia causata da insulino-resistenza e distruzione delle cellule  $\beta$  del pancreas. Questa malattia è correlata con fenomeni di aumento dello stress ossidativo, infiammazione e dislipidemia, che comportano maggior rischio di malattie cardiovascolari, cancro e retinopatie.

Il mirtillo modula l'attività di enzimi digestivi, la secrezione di insulina e il trasporto di glucosio (*McDougall GJ et al, 2008*).

Nei topi diabetici è in grado di ridurre la concentrazione di glucosio nel sangue e aumentare la risposta dei tessuti all'insulina (*Takikawa M et al, 2009*).

Risultati simili sono stati recentemente raggiunti anche nell'uomo (*Lankinen M et al, 2011*).

Le antocianine sono in grado di regolare l'espressione genica di adipocitochine le quali modulano l'attività degli adipociti. Inibiscono enzimi digestivi come la lipasi, diminuendo l'assorbimento dei grassi (*McDougall GJ et al, 2008*), per questo sono coinvolte nella comparsa di malattie come obesità e diabete (*Tsuda T et al, 2005*).

Essendo il cancro una patologia causata da danno al DNA, eccessiva presenza di ROS (*Cerutti PA et al, 1991*), proliferazione cellulare incontrollata, inibizione del processo di apoptosi e attivazione del fenomeno di angiogenesi (*Wang LS et al, 2008*) il mirtillo risulta essere anche una sostanza antitumorale (*Duthie SJ, 2007*).

Altri meccanismi di protezione contro il tumore possono coinvolgere una diretta interazione delle antocianine con il DNA: esse si intercalano al DNA prendendo così parte al controllo dell'espressione genica e proteggendo la doppia elica da danni ossidativi (*Sharma AD et al, 1999*).

*Vaccinium Myrtillus* possiede anche proprietà antimicrobiche contro patogeni umani come *Salmonella* e *Staphylococcus aureus* e agisce come agente batteriostatico. A differenza del puro

composto fenolico che agisce solo sui batteri gram negativi, l'estratto di mirtillo inibisce anche la crescita degli organismi gram positivi (*Puupponen-Pimiä R et al, 2005*).

È capace di inibire l'adesione batterica alle pareti dell'intestino e della vescica, per questo è utilizzato come antidiarroico e disinfettante urinario.

È in grado di combattere anche infezioni dell'apparato respiratorio che causano mal di gola e raffreddori. In un recente studio si è osservato che il succo di mirtillo inibisce l'adesione e la crescita di *Streptococcus pneumoniae* in cellule dei bronchi umani (*Huttunen S et al, 2011*).

Il mirtillo ha effetti positivi anche nei confronti di patologie a carico dell'occhio come glaucoma, cataratta e retinopatia diabetica perché migliora la resistenza capillare, rallenta la degenerazione maculare e l'opacità della lente. Inoltre migliora la visione notturna perché facilita la rigenerazione della rodopsina, il pigmento retinico atto alla visione con poca luce (*Camire ME, 2000*).

Molti studi epidemiologici hanno confermato questi effetti benefici sull'occhio (*Bravetti G et al, 1989; Kowluru RA et al, 2001*).

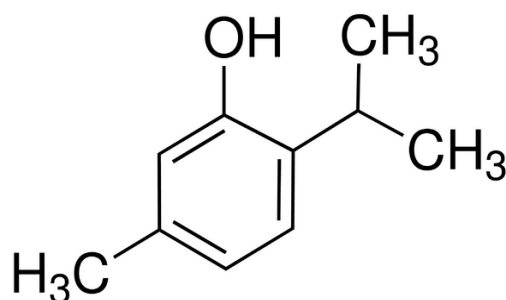
L'attività vasodilatatoria e antinfiammatoria di *Vaccinium Myrtillus* ha effetto sulla funzionalità neuromotoria, diminuendo il rischio di ictus.

Poiché il tessuto neuronale (tra cui la retina) è ricco di acidi grassi polinsaturi, l'attività antiossidante degli antociani è in grado di proteggere i siti suscettibili all'ossidazione. Per questo motivo il mirtillo (e in generale le bacche), è considerato un prodotto neuroprotettivo. Inoltre aumenta il rilascio di dopamina e migliora la comunicazione neuronale (anche se non si sa ancora molto sulla capacità del cervello di assorbire le antocianine).

Con il tempo aumenta la vulnerabilità dei tessuti ad attacchi ossidanti ed infiammatori a causa della mobilizzazione ed infiltrazione di cellule infiammatorie; ciò porta alla diminuzione di capacità cognitive e motorie tipiche di malattie neurodegenerative. L'utilizzo del mirtillo sembra ridurre l'incidenza di malattie causate dall'invecchiamento perché riduce la vulnerabilità dei tessuti (*Shukitt-Hale B et al, 2008*).

## 9. TIMOLO

Il timolo (2-isopropil-5-metilfenolo) è un composto fenolico contenuto in alcune piante aromatiche appartenenti alla famiglia delle Lamiaceae come quelle del genere *Origanum* e *Thymus* da cui il composto prende il nome (Kim Y-S et al, 2014).

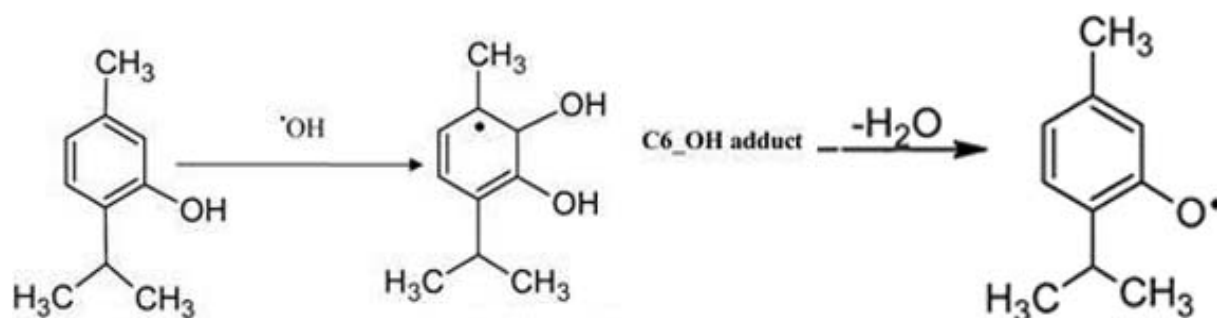


**Figura 10.** Timolo e sua struttura chimica

Il timo e i suoi estratti sono da sempre stati utilizzati nella medicina tradizionale per la cura di molte patologie a carico del sistema respiratorio grazie alle sue proprietà antisettiche, antispasmodiche e antitussive (Grosso C et al, 2010). Le proprietà antimicrobiche del timo sono state per molto tempo sfruttate anche in ambito alimentare dove il timo veniva aggiunto ai cibi non solo come aromatizzante ma anche come conservante (Ündeğer U et al, 2009). Largo uso dell'olio essenziale di timo viene fatto anche nell'industria cosmetica dove è utilizzato in profumi, colluttori e balsami per massaggi (Venu S et al, 2013). Sebbene ci siano delle differenze tra le varie specie, il timolo costituisce insieme al carvacrolo il principale costituente dell'olio essenziale di timo al quale conferisce le proprie attività biologiche tra cui le attività antiinfiammatoria e antibatterica (Ocaña A and Reglero G, 2012). A seconda della quantità in cui sono presenti i costituenti dell'olio essenziale si parla di differenti "chemotipi" (o polimorfismi chimici) e per quanto riguarda l'olio essenziale di timo ad oggi ne sono stati caratterizzati sette (Grosso C et al, 2010). I differenti chemotipi non vengono divisi in sottospecie in quanto le differenze sono spesso minime, riguardano esclusivamente la composizione dell'olio essenziale e sono legate alla variabilità individuale di ciascuna pianta (patrimonio genetico) o alle differenti condizioni di crescita (caratteristiche chimico-fisiche del terreno, clima

dell'ambiente di crescita) (Braga PC, 2006). Sull'estratto di timo e sul timolo puro sono stati effettuati, soprattutto negli ultimi anni, numerosi studi sia *in vivo* che *in vitro* volti a valutare sia gli eventuali aspetti citotossici e genotossici che le numerose proprietà, e principalmente quella antiossidante, da tempo attribuitegli. Modelli *in vitro* hanno recentemente dimostrato che il timolo è in grado di prevenire danni causati da stress ossidativo mostrando capacità antiossidanti e di neutralizzazione dei radicali liberi (Kim Y-S et al, 2014). Il timolo si è inoltre dimostrato in grado di ridurre la percentuale di cellule apoptotiche in seguito a trattamento con radiazioni gamma (Archana PR et al, 2009). Lo studio condotto da Riella e collaboratori nel 2012 è stato utile ad evidenziare l'effetto anti-infiammatorio e curativo delle ferite da parte del Timolo in roditori. Hanno dimostrato, mediante analisi istologica e conta totale delle cellule, che il Timolo riduce significativamente l'edema, ed inoltre, riduce l'afflusso di leucociti nell'area danneggiata. Ocana A e Reglero G nel 2012 hanno esaminato le proprietà di estratti di timo provenienti da tre diverse specie (*Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* e *Thymus hyemalis*), dimostrando una riduzione significativa dell'espressione genica di mediatori proinfiammatori (TNF- $\alpha$ , IL-1B e IL-6) ed un incremento marcato delle citochine anti-infiammatorie (IL-10). Lo studio condotto da Samara de Lira Mota K e i suoi collaboratori nel 2012 ha evidenziato l'attività antifungina dell'olio essenziale di *Thymus Vulgaris* e dei suoi principali costituenti (*Thymol* e p-cymene) nei confronti di *Rhizopus oryzae*, dimostrando una riduzione dello sviluppo miceliare e la germinazione delle sporangiospore. Nel 2011 Tsai ML e i suoi ricercatori dimostrarono, inoltre, il potere anti-infiammatorio e l'attività antimicrobica di oli essenziali provenienti da 5 erbe, tra cui *Thymus Vulgaris* del quale è stata rivelata la più elevata attività antiossidante e la capacità di diminuire la secrezione di TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-8 nelle cellule THP-1. Studi *in vivo* condotti su ratti hanno dimostrato un effetto protettivo del timolo, in seguito a pretrattamento cronico e cotrattamento, nei confronti di infarto miocardico (MI) indotto con somministrazione di isoprotrenolo (Meeran N et al, 2012). Un recente studio *in vivo* (Hashemipour H et al, 2013) è stato condotto su polli di allevamento con lo scopo di valutare gli eventuali benefici di una dieta arricchita con timolo e carvacolo. Questo studio ha dimostrato un aumento dose dipendente delle capacità antiossidanti e una diminuzione della lipoperossidazione nel muscolo della coscia. Tuttavia non è ancora completamente chiaro come il timolo possa svolgere questa sua azione antiossidante e solo alcuni autori hanno ipotizzato un possibile meccanismo d'azione in relazione all'attività di neutralizzazione del radicale idrossilico ( $\bullet$ OH). Il meccanismo ipotizzato (Venu S et al, 2013)

prevede una reazione di addizione elettrofila in cui il radicale idrossilico attacca l'anello benzenico con formazione di un OH-addotto il quale è poi soggetto ad una reazione di eliminazione di acqua con formazione di un radicale fenossilico stabile. Dal punto di vista termodinamico l'addotto per la cui formazione è richiesta la minore energia di attivazione è quello che si forma in posizione *para*; tuttavia gli addotti che si formano in posizione *orto* favoriscono la successiva reazione di eliminazione di H<sub>2</sub>O e quindi la formazione del radicale fenossile. Il meccanismo finale ipotizzato prevede dunque una reazione di addizione elettrofila in C6 (posizione *orto* che risulta termodinamicamente più stabile), con formazione di un addotto, alla quale segue disidratazione e formazione di un radicale fenossilico.



**Figura 11.** Meccanismo d'azione antiossidante del timolo

Per quanto riguarda gli aspetti genotossici del timolo al momento gli studi effettuati sono poco numerosi. Questi hanno però introdotto la possibilità che il timolo possa avere effetti genotossici sia in modelli in vitro che in vivo inducendo aberrazioni cromosomiche (*Azirak S and Rencuzogullari E, 2008; Buyukleyla M and Rencuzogullari E, 2009*). Questi studi rappresentano tuttavia delle valutazioni preliminari in quanto gli stessi autori introducono la possibilità che questo sia dovuto ad un utilizzo della sostanza a dosi elevate, situazione che in genere non si verifica nella realtà in quanto pressoché tutti gli oli essenziali vengono generalmente diluiti prima del loro utilizzo.



## **SCOPO DELLA RICERCA**

La radiazione solare, ed in particolare la sua componente ultravioletta, è un importante fattore naturale che presenta numerosi effetti benefici sulla salute dell'uomo tra cui attività disinfettante, proprietà immunoregolatorie, stimolazione della produzione di vitamina D e serotonina (*Michael F Holick PJ et al, 2004*). Le fonti artificiali di UVR vengono utilizzate per garantire la sterilità di utensili e ambienti ospedalieri, per scopi terapeutici come il trattamento di psoriasi e dell'ittero neonatale, per finalità estetiche (lampade abbronzanti) e industriali (laser UV). A questi vantaggiosi utilizzi si affiancano però una serie di studi che da qualche decennio correlano in maniera diretta l'esposizione alla luce solare e l'insorgenza di tumori cutanei di natura sia benigna che non (*Afaq F, 2011*). L'azione cancerogena della frazione ultravioletta della luce solare sta nella sua capacità di indurre mutazioni in quei geni definiti oncosoppressori, oncogeni e nei geni coinvolti nel controllo del ciclo cellulare innescando così quei meccanismi alla base dell'inizio, promozione e progressione tumorale (*Hussein MR, 2005*). Le componenti ultraviolette di maggiore interesse nello studio della fotocancerogenesi sono le radiazioni ultraviolette A (UVA) e le radiazioni ultraviolette B (UVB) (*Ikehata H and Ono T, 2011*); la componente ultravioletta di tipo C viene completamente assorbita dall'ozono atmosferico per cui, sebbene sia potenzialmente la più dannosa, non viene considerata in questo tipo di studi.

I raggi UVA costituiscono la maggior componente ultravioletta che arriva sulla terra (95% di quelle totali emesse dal sole), penetrano nella cute fino al derma e causano principalmente produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). I ROS sono in grado di reagire con le basi della doppia elica, i fosfolipidi di membrana, le proteine e i componenti del mitocondrio (come la membrana e il DNA) danneggiandoli (*Phillipson RP et al, 2002*). L'irradiazione UVB raggiunge solo per il 5% la superficie terrestre e nonostante sia in grado di penetrare solo fino allo strato epidermico della cute risulta comunque estremamente dannosa a causa dell'alta energia che possiede. Gli UVB infatti vengono completamente assorbiti dalle macromolecole cellulari ed in particolare dal DNA il quale viene fortemente danneggiato in modo diretto con la formazione di dimeri di pirimidine e (6-4) fotoprodotto che possono portare a fenomeni apoptotici o di cancerogenesi (*Kulms D et al, 2002*).

I polifenoli sono un gruppo di metaboliti secondari prodotti dalle piante che si trovano abbondantemente in frutta e verdura. Possiedono proprietà organolettiche, antibatteriche, riparative e soprattutto antiossidanti: sono in grado, infatti, di chelare ioni metallici e di agire da scavenger di radicali liberi (Tarko T et al, 2013). Inoltre hanno la capacità di indurre l'espressione di geni coinvolti nel meccanismo di riparazione per escissione di nucleotidi (NER) il quale rimuove danni al DNA causati da irradiazione UV (Katiyar SK et al, 2010).

L'assunzione di composti contenenti polifenoli potrebbe prevenire o ridurre danni ossidativi che sono alla base di numerose patologie cardiovascolari, neurodegenerative, infiammatorie e tumorali (Stanner SA et al, 2003). In particolare, recentemente, queste sostanze sono state prese in considerazione come possibili agenti protettivi per ridurre gli effetti negativi indotti dalla radiazione UV.

Il *Vaccinium Myrtillus* è la specie di mirtillo nota per contenere una grande varietà di composti fenolici come flavonoli (quercetina e catechine), tannini, acidi fenolici ma soprattutto antocianine (Seeram NP, 2008): è inoltre la varietà che ha il più alto contenuto di antocianine paragonato ad altri frutti come fragole, lamponi, sambuco e mirtillo rosso (Koponen JM, 2007). Nonostante siano ben note da tempo le proprietà antiossidanti di *Vaccinium Myrtillus*, grazie all'elevato contenuto di antociani, l'azione del mirtillo riguarda anche pathway di segnale cellulare, espressione genica, riparo del DNA, adesione cellulare ed effetti antineoplastici e antimicrobici (Seeram NP, 2008).

Studi *in vitro* volti a valutare l'attività degli antociani ne hanno dimostrato la capacità, ad esempio, di inibire la lipoperossidazione e rimuovere i radicali idrossilici (Laplaud PM et al, 1997). Sono, inoltre, ben conosciute le loro capacità antinfiammatorie in quanto capaci di inibire l'attivazione di NF-kB (Karlsen A et al, 2007) e l'attività del proteasoma, che ha il compito di degradare le proteine cellulari (Dreiseitel A et al, 2008). Le antocianine, invece, sono in grado di proteggere da danno da riperfusione dopo ischemia (Bertuglia S et al, 1995).

Studi su animali confermano l'attività antiossidante del mirtillo (Kolossova NG et al, 2006; Lala G et al, 2006) e solo recentemente sono stati visti effetti anche nell'uomo (Karlsen A et al, 2010; Kolehmainen M et al, 2012). Inoltre, studi *in vivo* condotti sia sul topo che sull'uomo (Takikawa M et al, 2009; Lankinen M et al, 2011) hanno dimostrato gli effetti ipoglicemici del mirtillo

soprattutto nel diabete tipo II, la sua capacità di modulare la secrezione di insulina e il trasporto di glucosio (McDougall GJ et al, 2008). Infine, sono noti anche gli effetti cardioprotettivi del mirtillo, la sua capacità di inibire l'aggregazione piastrinica, aumentare il colesterolo HDL e abbassare la pressione sistolica (Erlund I et al, 2008).

Il timolo è un composto fenolico contenuto nell'olio essenziale di numerose piante aromatiche ed in particolare in quelle del genere *Origanum* e *Thymus* di cui costituisce il maggior componente (Kim Y-S et al, 2014) e a cui dona le proprie attività biologiche. Le proprietà del timolo sono da tempo conosciute e sfruttate in vari campi come nella medicina tradizionale per la cura di patologie a carico del sistema respiratorio, nell'industria alimentare come conservante e nell'industria cosmetica dove viene aggiunto a profumi, colluttori e balsami per massaggi (Ündeğer U et al, 2009; Grosso C et al, 2010; Venu S et al, 2013). Negli ultimi decenni gli studi su questo composto si sono focalizzati sulla sua capacità antiossidante, supportati da un più generale interesse per i composti di origine naturale in relazione alla crescente associazione di una serie di patologie croniche alla presenza di stress ossidativo (Anthony KP et al, 2012). Gli studi sulle capacità antiossidanti del timolo sono numerosi e si sono fino ad ora concentrati su stress ossidativo indotto da agenti chimici (Ündeğer U et al, 2009; Amiri H, 2012; Kim Y-S et al, 2014) o da radiazioni ionizzanti (P.R A et al, 2011). Tuttavia nessuno studio ha per il momento valutato una possibile capacità protettiva nei confronti di UVA e UVB e risultano inoltre scarse le informazioni riguardanti l'attività del timolo nei confronti di danni genotossici in generale e nel particolare in seguito ad esposizione a radiazioni ultraviolette.

Lo scopo della ricerca è stato dunque quello di confermare i dati presenti in letteratura riguardo alla diversa tipologia di danno causato da UVA e UVB per poi valutare l'efficacia dell'estratto liofilizzato di *Vaccinium Myrtillus*, e l'attività del timolo nei confronti dei suddetti danni. Parallelamente all'attività del timolo è stata valutata, nei confronti dello stesso tipo di danno, l'attività di un estratto secco di *Thymus Vulgaris L.* al fine di valutare eventuali differenze attribuibili alla presenza di altri composti nell'estratto. Nel valutare la capacità antiossidante del timolo puro sono stati inoltre confermati i dati di letteratura che si riferiscono all'importanza nella scelta della dose della sostanza antiossidante in quanto alcuni tra gli antiossidanti più noti hanno mostrato un effetto pro-ossidante.

Gli esperimenti sono stati condotti su diversi modelli sperimentali: due modelli *in vitro* ed un modello *ex vivo*. Per gli esperimenti *in vitro* sono state utilizzate due linee cellulari di cheratinociti umani immortalizzati a diverso stadio differenziativo. I cheratinociti sono stati scelti come modello di studio essendo questo tipo cellulare la popolazione più presente negli strati inferiori dell'epidermide umana. Il modello *ex vivo* è rappresentato da biopsie di cute umana derivanti da operazioni di addominoplastica. È stato ritenuto opportuno condurre gli esperimenti sui due diversi modelli sperimentali per determinare se questa caratteristica potesse influenzare sia la responsività ai due raggi che la capacità protettiva delle sostanze prese in esame e da ciò poter iniziare valutazioni su possibili utilizzi *in vivo*. Nel modello *ex vivo* è stata testata l'attività del timolo e dell'estratto di timo in quanto risultati maggiormente protettivi nei confronti del danno indotto da raggi ultravioletti nel modello *in vitro*.

Per poter confermare i dati presenti in letteratura riguardanti il differente tipo di danno causato da UVA e UVB sono stati effettuati test in grado di valutare il danno ossidativo e quello genotossico e con gli stessi test è stato valutato l'effetto protettivo dell'estratto liofilizzato di *Vaccinium Myrtillus*, del timolo e dell'estratto di *Thymus Vulgaris L.* Il primo aspetto analizzato è stato la capacità delle sostanze testate di ridurre l'alterazione dello stato ossidoriduttivo intracellulare indotto dai raggi ultravioletti. Per questo motivo è stata quantificata sia la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) che i livelli intracellulari di malondialdeide (uno dei principali prodotti finali della lipoperossidazione) dopo aver pretrattato e irradiato le linee cellulari NCTC 2544 e HaCaT con UVA e UVB. Il danno ossidativo è stato valutato solo *in vitro* in quanto eseguito immediatamente dopo il trattamento con UVA e UVB mentre l'estrazione delle cellule epidermiche dai campioni *ex vivo* richiede dei tempi più lunghi la cui esecuzione avrebbe potuto dare dei risultati che non avrebbero rispecchiato la reale situazione di danno. L'aspetto genotossico è stato valutato attraverso l'utilizzo di tre diversi test: comet test alcalino, utile ad individuare rotture a singolo e doppio filamento di DNA e siti labili agli alcali, immunomarcatura dell'istone  $\gamma$ H2AX che indica presenza di rottura al doppio filamento e può essere utilizzato come test predittivo della formazione di micronuclei ed infine test dei micronuclei che permette di valutare alterazioni cromosomiche o del fuso mitotico.

Infine è ben noto che l'iperproduzione di ROS, unita alla presenza di elevati livelli di alterazioni a carico del DNA, può condurre all'innesco di eventi apoptotici per evitare accumulo di mutazioni. A tal proposito è stata dapprima testata l'effetto dei raggi UVA e UVB nei confronti

dell'alterazione del potenziale di membrana mitocondriale (evento a monte dei processi apoptotici) per capire se l'innesco della cascata apoptotica fosse dovuta a processi di danno diretto al DNA o se mitocondrio-mediato (ROS-mediato) ed infine è stato studiato il processo apoptotico nel suo complesso (apoptosi precoce e tardiva) mediante in test dell'annexina V. In tutti e due i test, inoltre, è stata anche valutata l'attività dei tre composti di origine naturale (pro-apoptotica o anti-apoptotica) nei confronti del danno apoptotico.

# **MATERIALI E METODI**

## **1. SISTEMI SPERIMENTALI**

### **1.1 Colture cellulari (*in vitro*)**

Gli esperimenti sono condotti su due diverse linee cellulari ottenute dall'Istituto Zooprofilattico di Brescia: NCTC-2544 e HaCaT.

Le cellule della linea NCTC-2544 sono cheratinociti umani indifferenziati immortalizzati (*Nogueira DR et al, 2011*); sono coltivate in terreno RPMI-1640 (Sigma Aldrich) contenente il 10% di siero fetale bovino inattivato dal calore (FBS, Biochrom), 2 mM di L-glutammina (Sigma) e 1% di una soluzione contenente penicillina (100 IU/ml Sigma) e streptomicina (100 µg/ml Sigma).

Le cellule della linea HaCaT sono cheratinociti umani immortalizzati spontaneamente, altamente differenziati (*Nogueira DR et al, 2011*). Sono coltivate in terreno DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium Sigma) arricchito con il 10% di siero fetale bovino inattivato dal calore (FBS, Biochrom), 4 mM di L-glutammina (Sigma), 1% di MEM vitamin solution 100x (Sigma), 1% di MEM non-essential aminoacid solution 100x (Sigma) e 1% di una soluzione contenente penicillina (100 IU/ml Sigma) e streptomicina (100 µg/ml Sigma).

Entrambe le linee sono fatte crescere in piastre Flask sterili da 75 cm<sup>2</sup> (Corning) in incubatore a 37°C addizionato del 5% di CO<sub>2</sub>. Raggiunta la confluenza, le cellule sono staccate con tripsina (Sigma), risospese in terreno di coltura completo e amplificate.

### **1.2 Colture organotipiche (*ex vivo*)**

Esperimenti sono stati condotti su biopsie di cute umana provenienti da donne non fumatrici di età compresa tra i 20 e i 40 anni sottoposte ad operazioni di addominoplastica in seguito a consenso informato. Le biopsie sono state mantenute in terreno DMEM a basso contenuto di glucosio (Sigma-Aldrich) completato con l'1% di una soluzione contenente penicillina (100 IU/mL, Sigma-Aldrich) e streptomicina (100 µg/mL, Sigma-Aldrich), il 2% di una soluzione di

L-glutammina (200mM, Sigma-Aldrich), 1.2 mg di amfotericina B (Sigma-Aldrich). Il mantenimento è avvenuto in piastre Transwell da 6 pozzetti (Corning) contenenti ognuno 1.5 mL di terreno completo nella parte inferiore della membrana e 0.5 mL nella parte superiore in modo che il derma fosse completamente circondato dal terreno di mantenimento e l'epidermide fosse invece esposta all'aria. Le piastre sono state posizionate in incubatore a 37°C e con il 5% di CO<sub>2</sub>. Per l'estrazione delle cellule dell'epidermide (*Reus AA et al, 2012*) i campioni bioptici sono stati prima tagliati in piccoli pezzi per favorire l'azione degli enzimi di estrazione, posti in piastre da 6 pozzetti (Corning) e incubati overnight a 4°C con termolisina (Sigma-Aldrich, 2mL/pozzetto) 200µg/mL in tampone acetato pH 7.4 con lo strato epidermico rivolto verso l'alto. Dopo l'incubazione con termolisina l'epidermide viene separata dal derma, posta in eppendorf da 1.5 mL e incubata per 20 minuti a 37°C con 200 µL di tripsina 0.25% (Sigma-Aldrich). L'azione della tripsina è bloccata con 1 mL di tampone fosfato salino (PBS 1X) addizionato con il 5% di siero fetale bovino (FBS, Biochrom). I campioni vengono quindi filtrati per selezionare solo le cellule epidermiche ed eliminare altri residui di tessuto con filtri in acciaio inossidabile di Mesh 200, che corrisponde ad un diametro delle maglie di 73.7 µm (Sigma-Aldrich) e centrifugati per 5 minuti a 2000 rpm. Il surnatante viene aspirato e il pellet risospeso in 500 µL della soluzione di PBS+5%FBS per effettuare la conta cellulare con il metodo del Trypan Blue (Sigma-Aldrich) e successivamente eseguire gli esperimenti di seguito indicati.

## **2. SISTEMA DI IRRADIAZIONE UV**

Il sistema di irradiazione consiste in quattro lampade UVA (picco 365 nm) disposte a coppie e due lampade UVB (picco 312 nm) (TRIWOOD 31/36, Helios Italquartz). L'irradianza dei raggi UVA è di 2.25 mW/cm<sup>2</sup>, quella dei raggi UVB di 0.8 mW/cm<sup>2</sup>. L'intensità è misurata con il radiometro HD 2302.0 (Delta OHM). Prima dell'irradiazione viene rimosso il terreno di coltura dei campioni, è effettuato un lavaggio con PBS 1x (phosphate-buffered saline) e poi le cellule sono coperte con un sottile strato di PBS con il quale sono irradiate. In particolare, sono utilizzati 4 mL di PBS 1x per le piastre Petri da 100mm, 1mL per le piastre Petri da 60 mm e da 35 mm, 100µL per piastre da 96 pozzetti. Per impedire che le cellule si surriscaldino durante l'irradiazione le piastre vengono posizionate su del ghiaccio sostituito all'incirca ogni ora. Le

cellule di controllo subiscono gli stessi trattamenti degli altri campioni ma non sono esposte ai raggi UV.

### **3. COMPOSTI DI ORIGINE NATURALE TESTATI**

#### **3.1 Preparati liofilizzati di *Vaccinium Myrtillus***

L'estratto liofilizzato utilizzato negli esperimenti proviene dalla bacca di una specie di mirtillo selvatico, il *Vaccinium Myrtillus*. Raccolte in Val Camonica a maturità commerciale, le bacche vengono congelate a -80°C, tagliate a metà e successivamente liofilizzate. I frutti liofilizzati sono polverizzati con un omogenizzatore Waring e conservati a -20°C fino alle analisi. Il materiale è estratto con 15 ml di HBSS, vortexato per 40 secondi, poi centrifugato a 15000 RPM per 15 minuti a 4°C. La preparazione e la titolazione dei liofilizzati sono eseguite dal Dott. Roberto Lo Scalzo presso il Consiglio per la Ricerca in Agricoltura (C.R.A.), Unità di Ricerca per i Processi dell'Industria Agro-Alimentare (I.A.A.) via Venezian 26, Milano.

##### **3.1.1 Pretrattamento con *Vaccinium Myrtillus* (in vitro)**

Gli esperimenti prevedono un pretrattamento di entrambe le linee cellulari con l'estratto acquoso di *Vaccinium Myrtillus* (12,4% di peso secco, polifenoli totali 339,3 mg/100 g di prodotto fresco; antocianine totali 297,7 mg/100 g di prodotto fresco) ad una concentrazione di 320 µg/ml in terreno senza siero, per un'ora. Successivamente le cellule vengono sottoposte a diversi tempi di irradiazione con raggi UVA, o con raggi UVB.

#### **3.2 Timolo ed estratto di Timo (*Thymus Vulgaris L.*)**

Il timolo (5-Metil-2-(1-metiletil)-fenolo) utilizzato per gli esperimenti è stato acquistato presso Sigma-Aldrich ed ha una purezza  $\geq 99.5\%$ . Per ogni esperimento la polvere è stata sciolta in dimetilsolfossido (120 mg/mL, DMSO Sigma-Aldrich) e successivamente diluita in terreno RPMI-1640 o DMEM senza siero. La concentrazione finale di DMSO durante i trattamenti non ha mai superato lo 0.1% .

L'estratto di timo è stato fornito da EPO S.r.l. Istituto Farmochimico Fitoterapico di Milano. È un estratto secco acquoso ottenuto mediante idrodistillazione dalle foglie di *Thymus vulgaris L.* L'estratto ha una purezza del 65% - 85%, la restante percentuale è rappresentata da maltodestrina



da mais, utilizzata come eccipiente. Per effettuare i trattamenti la polvere di estratto è stata sciolta in DMSO (150 mg/mL) e successivamente diluita in terreno RPMI-1640 o DMEM senza siero. La concentrazione finale di DMSO durante i trattamenti non ha mai superato lo 0.1%.

### **3.2.1 Pretrattamento con timolo ed estratto di Timo (*Thymus Vulgaris L.*, *in vitro* ed *ex vivo*)**

Gli esperimenti prevedono un pretrattamento dei campioni con timolo o con estratto di *Thymus Vulgaris L.* per un' ora; i campioni non trattati vengono invece mantenuti in terreno RPMI-1640 o DMEM completo per lo stesso tempo dei campioni trattati. La concentrazione di timolo utilizzata è di 6.6  $\mu$ M (1 $\mu$ g/mL) mentre quella di estratto è di 1.82  $\mu$ g/mL, concentrazione che in riferimento alla letteratura corrisponde ad 1 $\mu$ g/mL di timolo puro (Ocaña A and Reglero G, 2012; Satooka H and Kubo I, 2014; Kim Y-S et al, 2014).

## **4. DOSI DI IRRADIAZIONE UVA ED UVB**

Terminati i pretrattamenti dei due sistemi *in vitro* ed *ex vivo* con le sostanze in esame, i campioni vengono sottoposti a diverse intensità di irradiazione con raggi UVA, in un range compreso tra i 16 e i 24 J/cm<sup>2</sup> (10 J/cm<sup>2</sup> corrispondono a circa 30 minuti di esposizione al sole, a mezzogiorno, in Europa Centrale) o con raggi UVB, nell'intervallo 0.016-0.72 J/cm<sup>2</sup> (0.032 J/cm<sup>2</sup> corrispondono a circa 1-2 minuti di esposizione al sole, a mezzogiorno, in Europa Centrale). Gli esperimenti di valutazione delle specie reattive dell'ossigeno sono stati condotti immediatamente dopo la fine dell'irradiazione a causa della elevata reattività di questi composti. I test di citotossicità e genotossicità invece, sono stati eseguiti 24 ore dopo la fine dell'irradiazione perché sono necessarie circa 24 ore per permettere l'innescò dei sistemi di danno (ed eventualmente di riparo) a carico del genoma. Le valutazioni citotossiche, ossidative e genotossiche sono state supportate da analisi morfologiche (test di proliferazione cellulare, colorazione ematossilina eosina, test dell'istone H2AX su sezioni incluse in paraffina) eseguite in collaborazione col gruppo del Laboratorio di Morfologia strutturale e Ultrastrutturale della Prof.ssa Elena Donetti.

## **5. TEST DI CITOTOSSICITA'**

### **5.1 Test di vitalità cellulare (MTT, *in vitro*)**

L'MTT è un test colorimetrico utilizzato per misurare la vitalità cellulare attraverso la valutazione della funzionalità mitocondriale. Questo test si basa infatti sull'attività dell'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi nei confronti del colorante bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT, Sigma-Aldrich) che, nelle cellule vive, viene convertito nel sale insolubile formazano. La quantità di formazano prodotto è proporzionale al numero di cellule metabolicamente attive e dunque vive. L'MTT test permette quindi di evidenziare l'azione citotossica di una sostanza che, se provoca un abbassamento della vitalità cellulare del 50% rispetto al controllo (a cui si attribuisce il 100% di vitalità), porta ad escludere l'utilizzo della sostanza alla dose in esame. Nei nostri esperimenti l'MTT test è stato utilizzato per individuare le dosi non citotossiche di irradiazione, di *Vaccinium Myrtillus*, timolo ed estratto di timo utilizzabili nei successivi test di genotossicità e apoptosi.

Per questo test le cellule NCTC 2544 ed HaCaT sono coltivate in piastre trasparenti da 96 pozzetti (Corning) in terreno RPMI-1640 o DMEM (Sigma-Aldrich) completo, rispettivamente. Dopo 24 ore dalla fine del pretrattamento descritto nel punto 3.1.1 e 3.2.1 si aspira il terreno e si aggiungono 20 µL di bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (soluzione madre: 5 mg di MTT in 1 mL di PBS 1x) diluiti 1:10 in terreno completo e si lascia in incubatore a 37°C per 3 ore (NCTC-2544) o per 4 ore (HaCaT). Al termine dell'incubazione si aspira il terreno con l'MTT e si aggiungono 150 µL di DMSO (Sigma-Aldrich) per pozzetto, in modo da favorire la solubilizzazione dei sali di formazano prodotti lasciando la piastra in agitazione a temperatura ambiente per 5 minuti. La valutazione della quantità di sali di formazano prodotta è effettuata tramite lettura allo spettrofotometro (Multilabel counter Victor Wallac 1420) alla lunghezza d'onda di 550 nm (*Price P and McMillan TJ, 1990*).

### **5.2 Test di danno tissutale (LDH Activity Test, *ex vivo*)**

Il test dell'LDH è un test colorimetrico che permette di evidenziare la presenza di danno tissutale. Il lattato deidrogenasi è un enzima citosolico che catalizza l'interconversione di piruvato e lattato. In presenza di un danno tissutale le cellule rilasciano LDH la cui quantificazione viene dunque utilizzata come indice di danno. Nei miei esperimenti è stato

utilizzato questo test nel modello *ex vivo* con lo scopo di valutare gli effetti delle dosi di irradiazione sulla permeabilità di membrana. Il test è stato eseguito utilizzando il Lactate Dehydrogenase Activity Assay Kit (Sigma-Aldrich): il kit sfrutta la capacità della lattato deidrogenasi di ridurre il NAD a NADH.

Per questo test viene prelevato il surnatante dei campioni biotipici un'ora dopo i pretrattamenti esposti nel punto 3.2.1. L'esperimento è stato eseguito secondo le indicazioni presenti nel kit. In ciascun pozzetto di una piastra da 96 pozzetti (Corning) vengono aggiunti: 25µL di campione, 25µL di LDH Assay Buffer e 50µL di Master Reaction Mix1. Dopo aver aggiunto la Master Reaction Mix si procede alla lettura allo spettrofotometro (Multilabel counter Victor Wallac 1420) alla lunghezza d'onda di 450 nm. Viene effettuata una lettura al  $t_0$  (immediatamente dopo l'aggiunta della Master Reaction Mix1), in modo da avere l'attività basale della lattato deidrogenasi, i campioni vengono poi tenuti in incubatore a 37°C e viene effettuata un'altra lettura al  $t_{15}$  (15 minuti dopo l'aggiunta della Master Reaction Mix1). I valori di assorbanza ottenuti vengono interpolati su una curva standard per avere la quantità di LDH presente nel campione. I risultati sono espressi come attività dell'enzima lattato deidrogenasi (LDH Activity) come indicato nel kit.

1Master Reaction Mix: 2µL LDH Substrate Mix, 48µL LDH Assay Buffer.

### **5.2.1 Retta Standard LDH**

La retta standard utilizzata per la quantificazione di LDH nei nostri campioni viene creata utilizzando le indicazioni presenti nel kit (Lactate Dehydrogenase Activity Assay Kit, Sigma-Aldrich) con concentrazioni scalari di NADH.

## **6. ANALISI MORFOLOGICA DELLE SEZIONI DI CUTE UMANA**

### **6.1 Colorazione con Ematossilina-Eosina**

L'**ematossilina-eosina** è una delle colorazioni d'insieme più comune, usata anche nelle nostre condizioni sperimentali, che permette di evidenziare le diverse componenti cellulari.

L'*ematossilina* è un colorante naturale estratto dal legno di campeggio proveniente dall'America meridionale e dalle Indie. E' un colorante basico e, per questa caratteristica, si lega alle

componenti acide del campione, mettendo in evidenza i nuclei che si colorano di blu. In laboratorio abbiamo usato l'ematossilina di Mayer, in soluzione commerciale.

L'*eosina* è il colorante di contrasto d'elezione per l'ematossilina, è un colorante artificiale che presenta una colorazione arancione e ha affinità per le componenti basiche del citoplasma conferendo una colorazione rosata. In laboratorio abbiamo usato una soluzione acquosa allo 0,3% acidificata con 2-3 gocce di acido acetico.

Dopo 24 ore dalla fine dell'irradiazione, tutti i campioni (5x5 mm) sono fissati per immersione in paraformaldeide 4% in PBS 0.1 M (pH 7.4) per 5 ore a temperatura ambiente, disidratati con una scala ascendente di etanoli, chiarificati in xilolo ed incluse in paraffina. Dai blocchetti in paraffina sono state ottenute sezioni seriate di 4 µm utilizzando un microtomo a rotazione (RM2245, Leica Microsystems GmbH Wetzlar, Germany), raccolte su vetrini precedentemente trattati con 3-ammino propil-trietossi-silano per favorire l'adesione delle sezioni. Mediante la combinazione dei due coloranti si ottiene un quadro generale della struttura tridimensionale della cute. Per ogni campione almeno 5 vetrini non consecutivi sono stati colorati con Ematossilina/Eosina. L'esperimento è stato condotto secondo la metodica indicata da *Donetti E e collaboratori (2014)*.

## **6.2 Analisi della proliferazione cellulare mediante saggio con 5'-Bromo-2'-deossipuridina**

Per valutare il grado di proliferazione cellulare, abbiamo utilizzato una metodica precedentemente messa a punto nel laboratorio della Prof.ssa Donetti in un modello sperimentale di colture organotipiche di cute (Donetti et al., 2005; Bedoni et al., 2007) e mucosa orale umana normale (Donetti et al., 2009). Le sezioni in paraffina sparaffinate e reidratate, sono state immerse in acido cloridrico (HCl) 2N per indurre l'apertura della doppia elica di DNA. Dopo aver ridotto l'acidità determinata dall'HCl con tetraborato di sodio ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ) 0.1M, il trattamento con pepsina 0,05% pH 1.5 per 25 minuti a 37°C ha permesso di rompere i legami crociati formati fra le proteine tessutali ed il fissativo che potrebbero impedire il riconoscimento antigene-anticorpo. Le sezioni sono state poi incubate con un anticorpo monoclonale specifico per il DNA di cellule che hanno incorporato la BrdU (mouse anti human BrdU, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) diluito 1:200 per 60 minuti a temperatura ambiente e successivamente rivelato grazie a un anticorpo secondario goat anti-mouse coniugato FITC (fluorescein isothiocyanate, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Baltimore Pike, West

Grove, PA) diluito 1:200 e incubato per 60 minuti a temperatura ambiente. Due operatori in doppio cieco hanno contato le cellule positive alla BrdU, cioè quelle in attiva proliferazione. Il numero ottenuto è stato normalizzato rispetto all'area di epidermide vitale, ad esclusione dello strato corneo. Questi calcoli sono stati effettuati grazie al software di analisi d'immagine Image Pro Plus 4.5 (version 4.5.019; Media Cybernetics Inc., Silver Spring, MD, U.S.A.) che permette il calcolo dell'area di epidermide vitale selezionata su immagini digitali da noi ottenute con microscopio Nikon Eclipse 80i collegato alla fotocamera digitale Nikon Ds-5Mc (Nikon) a ingrandimento 10x da sezioni colorate con ematossilina-eosina adiacenti a quelle utilizzate per la reazione di immunofluorescenza. L'operazione di normalizzazione è necessaria al fine di evitare un'errata stima della proliferazione cellulare, che viene infine espressa come numero di cellule positive alla BrdU per mm<sup>2</sup> di epitelio vitale.

## **7. ANALISI DEL CICLO CELLULARE (*in vitro ed ex vivo*)**

L'analisi del ciclo cellulare al citofluorimetro viene effettuata per determinare la distribuzione delle cellule nelle diverse fasi del ciclo ed individuare eventuali alterazioni nella sua corretta progressione. Questa analisi si basa sulla quantificazione del contenuto di DNA cellulare sfruttando l'utilizzo di un colorante che si intercala ad esso. Il controllo positivo utilizzato è costituito da cellule trattate per un' ora con un induttore di apoptosi (staurosporina 8.56µM, Sigma-Aldrich).

Per questo esperimento le cellule vengono piastrate in Petri da 60mm (Corning). Dopo 24 h dalla fine dei trattamenti si effettua un lavaggio in phosphate-buffered saline (PBS 1x) e si staccano le cellule con 300 µL di tripsina (Trypsin-EDTA solution 1x, Sigma-Aldrich) per 5 minuti a 37°C. Le cellule vengono quindi raccolte con un 1mL di PBS addizionato col 2% di siero fetale bovino (PBS+2% FBS) (FBS, Biochrom) e centrifugate a 2000 rpm per 5 minuti. Il surnatante viene aspirato ed il pellet è risospeso in 1 mL di PBS+2% FBS. Si effettua la conta cellulare con il metodo del Trypan Blue (Sigma) in modo da individuare, per ogni campione, un volume in cui vi siano 10<sup>6</sup> cellule/mL. Il volume calcolato viene prelevato e portato al volume di 1 mL con PBS+2% FBS. I campioni vengono quindi centrifugati a 2000 rpm per 5 minuti, il surnatante viene aspirato e si aggiunge ad ogni campione 1mL di soluzione per ciclo cellulare<sup>2</sup> che viene lasciata agire per 30 minuti a temperatura ambiente e al riparo dalla luce. Trascorso il tempo di

incubazione i campioni vengono trasferiti in tubi da FACS e letti al citofluorimetro (FACScalibur Becton Dickinson, laser ad Argon 488) alla lunghezza d'onda di eccitazione di 535 nm e di emissione di 617 nm (Nicoletti 1991).

<sup>2</sup>Soluzione per ciclo cellulare: 80% ioduro di propidio (Sigma-Aldrich) 50µg/mL in PBS 1X, 10% di RNAsi (Sigma-Aldrich) 0,5mg/mL in PBS 1X, 10% di Nonidet® P 40 substitute (Fluka) 0,1% in PBS 1X.

Il test è eseguito anche sulle cellule estratte da epidermide di biopsie, seguendo lo stesso protocollo descritto per le due linee cellulari.

L'analisi del ciclo cellulare è eseguita anche sulle cellule estratte da epidermide di biopsie, seguendo lo stesso protocollo descritto per le due linee cellulari.

## **8. VALUTAZIONE DELLO STATO DI OSSIDAZIONE CELLULARE (*in vitro*)**

### **8.1. Test di valutazione della quantità intracellulare di ROS**

Per valutare la produzione intracellulare delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) è stata utilizzata la sonda 2',7'-diclorofluoresceina diacetato (DCFH-DA, Sigma-Aldrich). Questa, essendo una molecola non polare, diffonde in cellula dove viene idrolizzata dalle esterasi intracellulari trasformandosi nel composto polare e non fluorescente 2',7'-diclorofluoresceina (DCFH). In presenza di ROS (principalmente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) la DCFH viene ossidata convertendosi nel composto fluorescente DCF.

Le cellule NCTC-2544 e HaCaT sono coltivate in piastre da 96 pozzetti nere con fondo trasparente (Corning). Immediatamente dopo la fine dei trattamenti con UVA o UVB precedentemente descritti si aspira il tampone fosfato salino di irradiazione e si aggiungono ad ogni pozzetto 100 µL di terreno completo a cui è stata aggiunta la sonda DCFH-DA alla concentrazione di 25 µM (soluzione madre: 50 mM in DMSO); le piastre sono poste in incubazione con la sonda per 30 minuti a 37°C. Successivamente si aspira il terreno con la sonda, si effettua un lavaggio con 100 µL di PBS 1X e si aggiungono 100 µL di PBS per la lettura allo spettrofotometro (Multilabel counter Victor Wallac 1420) che avviene ad una lunghezza d'onda di eccitazione di 485 nm e di emissione di 530 nm (Wang H and Joseph JA, 1999).

Al termine della lettura della fluorescenza si aggiungono ad ogni pozzetto 100  $\mu$ L di NaOH 0.1 M, le piastre vengono conservate a 4°C ed il giorno seguente si effettua il dosaggio proteico. I valori di fluorescenza trovati, infatti, vengono normalizzati sul quantitativo proteico utilizzando il metodo di Lowry (*Lowry OH et al, 1951*) ed espressi come % ROS/mg di proteine.

## **8.2 Valutazione della lipoperossidazione**

La perossidazione lipidica è un processo causato dall'interazione tra molecole ossidative reattive libere e atomi di idrogeno presenti nei lipidi: questo dà origine a radicali lipidici. Questi radicali sono a loro volta instabili e si legano facilmente all'ossigeno molecolare formando radicali perossili lipidici che sono in grado di ossidare altri lipidi, innescando così una reazione a catena. Le molecole più suscettibili ad un attacco radicalico sono gli acidi grassi insaturi, in particolare i polinsaturi presenti nei fosfolipidi ed il colesterolo che fanno parte delle membrane cellulari. Il principale prodotto di reazione della lipoperossidazione è la malondialdeide (MDA), un'aldeide reattiva in grado di reagire con la deossiguanina e la deossadenosina del DNA formando composti mutageni, precursori di carcinogenesi. Per stimare la quantità di MDA si sfrutta la sua reattività con l'acido tiobarbiturico (TBA): la condensazione di queste due molecole origina un composto fluorescente facilmente rilevabile spettrofotometricamente (*Hseu Y-C et al, 2012*).

Per questo esperimento entrambi le linee cellulari sono coltivate in piastre Petri da 100 mm (Corning). Al termine dell'irradiazione si lavano le piastre con 4 mL di PBS 1x, le cellule vengono staccate meccanicamente con uno scraper e raccolte in 1.2 mL di PBS 1x. Le cellule sono poi sottoposte a stress meccanico mediante frizione. Dall'omogenato così ottenuto si prelevano 200  $\mu$ L per campione, da distribuire in 2 pozzetti (100  $\mu$ L per pozzetto) di una piastra da 96 pozzetti (Corning) per effettuare il dosaggio proteico secondo il metodo di Lowry (*Lowry OH et al, 1951*) già utilizzato nell'esperimento di valutazione delle specie reattive dell'ossigeno. Per il campione corrispondente al bianco si utilizza 1 mL di PBS 1x che viene sottoposto agli stessi passaggi dei campioni trattati. La valutazione della lipoperossidazione continua con l'aggiunta, ad ogni campione, di 100  $\mu$ L di acido tricloroacetico (TCA, Sigma-Aldrich, 50% in H<sub>2</sub>O distillata). Dopo 20 minuti in centrifuga a 5000 rpm, si preleva 1 mL di surnatante a cui si aggiungono 1.1 mL di acido tiobarbiturico (TBA, Sigma-Aldrich, 0.6% in H<sub>2</sub>O distillata tenuto in agitazione a 50°C fino al momento dell'utilizzo). Successivamente i campioni vengono incubati a 100°C per 1 ora, messi poi in ghiaccio ed una volta raffreddati si aggiungono 3 mL di

isobutanolo (Merck). Infine i campioni vengono vortexati per 90 secondi e centrifugati a 5000 rpm per 5 minuti; questo passaggio porta alla formazione di due fasi nettamente distinte tra le quali quella superiore viene prelevata per l'analisi al fluorimetro (Perkin-Elmer LS-5 Luminescence Spectrometer) alla lunghezza d'onda di eccitazione di 515 nm e di emissione di 553 nm. I dati di fluorescenza trovati sono interpolati su una curva standard ottenuta con tre diverse concentrazioni di MDA (3, 5 e 10 nmol/mL). I risultati vengono in seguito normalizzati sui valori di proteine ed espressi come  $\mu\text{moli}$  di MDA/mg proteine.

### **8.2.1 Retta MDA**

Il giorno precedente all'esperimento si prepara una soluzione di Malondialdeide bis-acetilato diluita 1:1000 in metanolo. A questa si aggiunge una soluzione di HCl 0.2 N in rapporto 1:1. Il giorno seguente si prelevano 1.65 mL dalla soluzione preparata il giorno prima e si aggiungono 8.35 mL di metanolo creando così la soluzione madre. In quattro provette si mettono 2 mL di PBS 1x: nel campione corrispondente al bianco si aggiungono 10  $\mu\text{L}$  di metanolo mentre nelle altre, che rappresentano i valori standard della retta, 10  $\mu\text{L}$ , 5  $\mu\text{L}$  e 3  $\mu\text{L}$  di soluzione madre. Ad ogni campione si aggiungono 275  $\mu\text{L}$  di TCA (Sigma-Aldrich al 50% in  $\text{H}_2\text{O}$  distillata) e 2 mL di TBA (Sigma-Aldrich, 0.6 % in  $\text{H}_2\text{O}$  distillata). Le provette vengono incubate in bagnetto a  $100^\circ\text{C}$  per un'ora. Al termine dell'incubazione sono poste in ghiaccio e una volta raffreddate si aggiungono 4 mL di isobutanolo. Dopo aver agitato ogni provetta su vortex per 2 minuti e centrifugato a 5000 rpm per 5 minuti si preleva la fase superiore che viene letta al fluorimetro (Perkin\_elmer LS-5 Luminescence Spectrometer) con lunghezza d'onda d'eccitazione di 515 nm e di emissione di 553 nm.

### **8.3 Dosaggio delle proteine**

Per il dosaggio delle proteine si utilizza il metodo di Lowry e collaboratori (*Lowry OH et al, 1951*), prendendo l'albumina come campione standard di riferimento. Negli esperimenti di valutazione dei ROS vengono usati come campioni per il "bianco", lo "standard" e il "bianco standard" pozzetti privi di cellule contenenti rispettivamente 100  $\mu\text{L}$  di NaOH 0.1 M, 100  $\mu\text{L}$  di albumina 300  $\mu\text{g/mL}$  (Sigma-Aldrich) e 100  $\mu\text{L}$  di  $\text{H}_2\text{O}$  distillata. Negli esperimenti di valutazione della lipoperossidazione il "bianco" è rappresentato dal PBS 1x. In tutti i pozzetti si aggiungono 125  $\mu\text{L}$  di reattivo<sup>3</sup> e, dopo 10 minuti in agitazione a temperatura ambiente, 25  $\mu\text{L}$  di Folin (Folin & Ciocalteu's phenol reagent, Sigma-Aldrich) diluito 1:2 in  $\text{H}_2\text{O}$  distillata. Dopo



altri 30 minuti in agitazione a temperatura ambiente, si effettua la lettura allo spettrofotometro (Multilabel counter Victor Wallac 1420) alla lunghezza d'onda di 550 nm.

<sup>3</sup>Composizione del reattivo: 15 mL di soluzione A<sup>4</sup>, 15 mL di H<sub>2</sub>O distillata, 300 µL di soluzione B<sup>5</sup>, 300 µL di soluzione C<sup>6</sup>.

<sup>4</sup>Soluzione A: 4 g NaOH + 20 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, in 500 mL di H<sub>2</sub>O distillata

<sup>5</sup>Soluzione B: tartrato di Na 2% in H<sub>2</sub>O distillata

<sup>6</sup>Soluzione C: solfato di Cu 1% in H<sub>2</sub>O distillata

## **9. TEST DI GENOTOSSICITA' (in vitro ed ex vivo)**

### **9.1 Comet test alcalino (pH>13)**

L'elettroforesi su singola cellula (SCGE) o comet test, è un test di mutagenesi che permette di identificare danni al DNA di singole cellule. Questo test viene utilizzato per saggiare la capacità mutagena di sostanze chimiche o agenti fisici. Le cellule vengono poste su un vetrino portaoggetti preagarizzato e trattate con detergenti per lisare le membrane cellulari in modo che sul vetrino rimangano solo i nuclei che vengono sottoposti ad elettroforesi in una soluzione di corsa elettroforetica a pH alcalino (pH $\geq$ 13). La corsa elettroforetica a questo pH permette di evidenziare danni al singolo e doppio filamento (SSBs e DSBs) e siti labili agli alcali (*Marabini L et al, 2011*). Durante la corsa elettroforetica infatti, i filamenti integri (di grosse dimensioni) migrano scarsamente, mentre i frammenti derivati dai filamenti danneggiati migrano verso l'anodo in base al peso molecolare: più basso è quest'ultimo, maggiore sarà la distanza percorsa dal frammento durante la corsa. I frammenti migrano producendo una conformazione a "cometa" che risulta essere tanto più lunga quanto più è ingente il danno al DNA. Il DNA viene infine fatto legare da una sostanza fluorescente e viene così visualizzato tramite microscopio a fluorescenza. Per effettuare questo test le cellule NCTC-2544 ed HaCaT vengono coltivate in piastre Petri da 60 mm (Corning). L'esperimento è condotto al riparo dalla luce e i campioni sono mantenuti in ghiaccio in modo da diminuire l'attività di enzimi che possono aumentare il danno genotossico di base. Dopo 24 ore dalla fine delle irradiazioni i campioni sono lavati con 2 ml di PBS (una volta per NCTC-2544, 3 volte per HaCaT) e le cellule vengono staccate con tripsina (Sigma): 300 µl per 5 minuti a 37°C per le NCTC-2544, 1 ml per 3 minuti a temperatura ambiente e successivamente 400 µl per 5 minuti a 37°C per HaCaT. Avvenuto il distacco, si blocca la tripsina con 1 ml di terreno completo e si centrifugano i campioni per 5 minuti a 2000 rpm. Dopo

aver aspirato il surnatante, si aggiunge 1 ml di terreno completo e si sgruma il pellet con una pasteur in plastica. Si effettua poi la conta cellulare con il metodo del Trypan Blue (Sigma). Un volume corrispondente a  $2 \times 10^4$  cellule/mL viene risospeso in una soluzione di agarosio a basso punto di fusione (Low Melting Agarose, Sigma-Aldrich) 0.5% in PBS 1x e posto su un vetrino portaoggetti preagarizzato (Agarose for routine use) 1% in PBS 1x. Su ogni vetrino vengono messi 85  $\mu$ L di "LMA+cellule" che vengono coperti con un vetrino coprioggetto e messi a 4°C per 10 minuti per favorire la solidificazione dell'LMA. Dopo questi primi 10 minuti il vetrino coprioggetto viene delicatamente tolto, si aggiungono altri 85  $\mu$ L di agarosio a basso punto di fusione (LMA) e i vetrini con il proprio coprioggetto sono posti nuovamente a 4°C per altri 10 minuti in modo da creare una trama (definita "sandwich") all'interno della quale si trovano le cellule. Al termine di questi 10 minuti i vetrini, privi del coprioggetto, vengono immersi in una soluzione di lisi<sup>7</sup> per 1 ora a 4°C. Questo passaggio è necessario per lisare le membrane e liberare l'acido nucleico. Al termine della lisi i vetrini sono lavati con 2 mL di soluzione di neutralizzazione<sup>8</sup> e successivamente inseriti in vasca elettroforetica riempita con il tampone di corsa<sup>9</sup> e tenuta in ghiaccio per evitarne il surriscaldamento. Prima della corsa elettroforetica i vetrini vengono lasciati stabilizzare per 20 minuti nella vasca in modo che il DNA si possa srotolare. Dopo la fase di stabilizzazione viene avviata l'elettroforesi (30 minuti, 300 mA). Terminata la corsa, i vetrini vengono lavati con 2 ml di soluzione di neutralizzazione che si lascia agire per 5 minuti a temperatura ambiente, ed infine i vetrini sono fissati mediante immersione in etanolo (Fluka) a -20°C per 5 minuti. I vetrini si fanno poi asciugare overnight e, una volta asciutti, vengono colorati con 500 $\mu$ L di ioduro di propidio (Sigma-Aldrich, 20 $\mu$ g/mL in H<sub>2</sub>O distillata) un intercalante fluorescente del DNA. A questo punto i vetrini vengono osservati al microscopio a fluorescenza (Axioplan). Per ogni vetrino vengono fotografate in maniera random 50 cellule. In assenza di danno il nucleo appare rotondo e compatto; nel caso vi siano rotture, invece, i gruppi fosfato dei nucleotidi (che sono carichi negativamente) migrano verso l'anodo formando una struttura allungata e disomogenea, simile alla coda di una cometa. Maggiore è il danno, più grande è la cometa. Ogni cellula fotografata viene classificata in modo arbitrario a seconda del tipo di cometa, considerando i criteri descritti in tabella (Tab.1). Alla classificazione arbitraria dei nucleoidi, si unisce l'analisi computerizzata (software CometScore<sup>TM</sup> freeware) che permette di valutare i tre parametri utili a descrivere le comete e di conseguenza l'entità del danno: lunghezza della coda (tail length), % di DNA nella coda e tail

moment, che è il prodotto dei due precedenti parametri (ciò non viene effettuato per le cellule di tipo E).

<sup>7</sup>Soluzione di lisi (da portare a pH 10 con HCl fumante 37%): 71 mL stock lisi<sup>7.1</sup>, 10% DMSO (8 mL), 1% Triton X-100 (0,8 mL )

<sup>7.1</sup>Stock lisi: 2.5 M NaCl, 100 mM Na-EDTA, 10 mM Tris, 250 mM NaOH

<sup>8</sup>Soluzione di neutralizzazione (da portare a pH 7.5 con HCl 37% fumante): 0.4 M Tris

<sup>9</sup> Tampone di corsa alcalino: 300 mM NaOH, 1 mM Na-EDTA

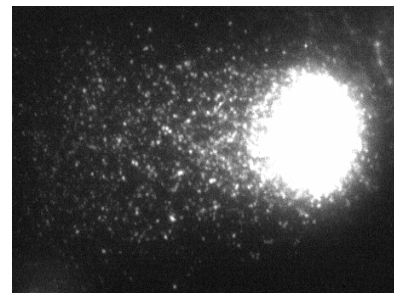
L'esperimento comet test è eseguito anche sulle cellule estratte da epidermide di biopsie, seguendo lo stesso protocollo descritto per le due linee cellulari (*Reus AA et al, 2012*).

<b>Classificazione</b>	<b>Tipo di danno</b>
<b>A</b>	Nucleo tondeggiate, intero, assenza di coda
<b>B</b>	Coda appena evidente
<b>C</b>	Coda evidente, nucleo ben distinto
<b>D</b>	Coda evidente, nucleo difficilmente distinguibile
<b>E</b>	Cellula completamente deteriorata, nucleo non distinguibile, ghost

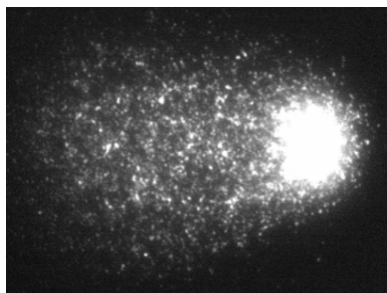
**Tabella 1.** Catalogazione arbitraria delle cellule esaminate al microscopio



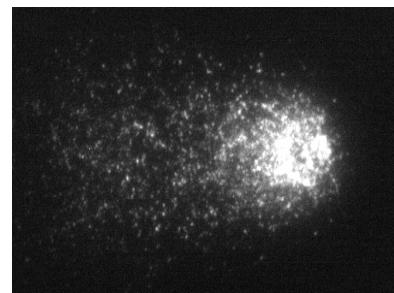
Cellula tipo 'A'



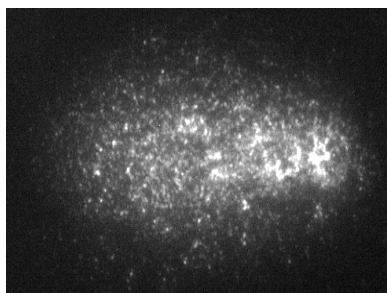
Cellula tipo 'B'



Cellula tipo 'C'



Cellula tipo 'D'



Cellula tipo 'E'

## 9.2 Test dell'istone H2AX fosforilato ( $\gamma$ -H2AX)

Le tecniche di immunomarcatura vengono generalmente utilizzate per identificare la localizzazione di componenti cellulari o tissutali attraverso l'uso di anticorpi specifici. A seconda del principio sfruttato per la visualizzazione dell'avvenuta reazione tra antigene e anticorpo si hanno due tipi di immunomarcatura: tecniche immunoenzimatiche (sfruttano reazioni enzimatiche che generano composti colorati) e tecniche di immunofluorescenza (si basano sull'utilizzo di fluorocromi). La marcatura può essere diretta o indiretta; nel primo caso viene utilizzato un solo anticorpo che porta già legata la sostanza che permetterà di visualizzare l'avvenuta marcatura, nel secondo caso si utilizza un anticorpo primario che si lega agli antigeni

di interesse al quale viene poi fatto legare un anticorpo secondario che reca il fluorocromo. Il vantaggio di utilizzare una marcatura indiretta sta nel fatto che questa permette l'amplificazione del segnale in quanto ad un solo anticorpo primario si possono legare più anticorpi secondari. Nei miei esperimenti è stata utilizzata la tecnica dell'immunofluorescenza con marcatura indiretta.

La tecnica è stata utilizzata per visualizzare la presenza di fosforilazione dell'istone H2AX a livello della serina 139. Questo evento è considerato un marker molto specifico di rotture al doppio filamento di DNA (DSB) (Rogakou EP et al, 1998) e può essere usato come predittivo per la formazione di micronuclei (Caputo F et al, 2012). Si pensa che nei primi 30 minuti successivi alla formazione dei DSB, un elevato numero di molecole di istone fosforilato ( $\gamma$ H2AX) si localizzino nella cromatina in corrispondenza del sito di rottura, richiamando proteine implicate nei processi di riparo del DNA e rimodellamento della cromatina. E' possibile visualizzare le singole rotture al doppio filamento di DNA mediante l'utilizzo di specifici anticorpi anti- $\gamma$ H2AX.

Il test dell'istone  $\gamma$ H2AX, utile ad individuare le DSBs, permette anche di detectare le cellule precancerose, conoscere lo stadio tumorale, monitorare l'efficacia di terapie farmacologiche contro il cancro e lo sviluppo di nuovi farmaci anticancro (Bonner WM et al, 2008).

### **9.2.1 Test dell'istone H2AX fosforilato ( $\gamma$ -H2AX, *in vitro*)**

Il test per detectare la fosforilazione dell'istone H2AX è stato condotto *in vitro* seguendo il protocollo indicato da Wischermann K. and colleagues nel 2008, apportando alcune modifiche. Le cellule NCTC-2544 ed HaCaT sono state piastrate in Petri da 35mm e fatte crescere su un vetrino coprioggetto circolare del diametro di 21mm precedentemente sterilizzato con etanolo e inserito nella Petri. L'esperimento di immunofluorescenza è stato eseguito 1 ora dopo la fine delle irradiazioni. Le cellule sono state inizialmente fissate con metanolo freddo (-20°C) per 10 minuti a temperatura ambiente. Dopo la fissazione sono stati effettuati tre lavaggi da 5 minuti ognuno in tampone fosfato salino (PBS 1x). Le membrane sono state poi permeabilizzate per favorire il successivo ingresso degli anticorpi con una soluzione di Triton X-100 0.5% in PBS (Sigma-Aldrich) per 20 minuti a temperatura ambiente ed in seguito sono stati effettuati tre ulteriori lavaggi da 5 minuti ognuno in PBS 1x in modo da eliminare completamente la soluzione di permeabilizzazione. Al termine dei lavaggi sono stati bloccati i siti aspecifici con albumina di

siero bovino (Sigma-Aldrich) 3% in PBS 1x per 30 minuti a temperatura ambiente. Durante il blocco dei siti aspecifici si prepara una camera umida nella quale verranno posti i campioni per l'incubazione con gli anticorpi. L'anticorpo primario utilizzato è un Anti-fosfo-istone H2AX (Ser 139) monoclonale prodotto in topo (1mg/mL, Millipore), è stato diluito 1:150 in BSA 1% (in PBS 1x) e lasciato incubare con i campioni per 2 ore a temperatura ambiente. Al termine dell'incubazione sono stati effettuati tre lavaggi con PBS 1x da 5 minuti ciascuno e i campioni sono stati poi incubati per 1 ora con l'anticorpo secondario (1:500 in BSA 1%), un Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (2mg/mL, Life Technologies <sup>TM</sup>) a cui è legato il fluorocromo Alexa Fluor <sup>®</sup> 488. Infine i campioni vengono sottoposti a tre lavaggi in PBS 1x per 5 minuti e un in H<sub>2</sub>O dopo i quali vengono montati sul vetrino portaoggetti con l'aiuto di un montante (Vectashield<sup>®</sup> Mounting Medium with DAPI, VECTOR) e conservati a 4°C fino al momento della lettura al microscopio confocale Zeiss LSM 510-Meta.

Le immagini acquisite sono state analizzate col programma ImageJ attraverso cui le cellule sono state inserite in una delle tre diverse fasce di danno in base al numero di *foci* visualizzati per ogni cellula.

### **9.2.2 Test dell'istone H2AX fosforilato ( $\gamma$ -H2AX) su sezioni in paraffina (*ex vivo*)**

Per analizzare la fosforilazione dell'istone H2AX su sezioni di biopsia incluse in paraffina, queste sono state incubate in sodio citrato 0.01 M, 120°C per 6 minuti, per smascherare l'antigenicità. Dopo ripetuti lavaggi in PBS 0.1 M (pH 7.4), i siti di legame non specifici sono saturati con una soluzione 1:10 di goat serum (Vector) in PBS 0.1 M (pH 7.4) per 30 minuti a temperatura ambiente. Le sezioni sono incubate con anticorpo primario monoclonale rabbit anti-phospho-Histone H2A.X (Millipore; dilution 1:50; 60 min a temperatura ambiente). Successivamente sono state incubate con un anticorpo secondario goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 (Molecular Probes; dilution 1:200; 60 min a temperatura ambiente).

In tutti gli esperimenti di immunofluorescenza, nel controllo negativo, l'utilizzo dell'anticorpo primario è stato omesso e sostituito da PBS 0.1 M (pH 7.4). Le immagini sono acquisite mediante l'utilizzo del microscopio Nikon Eclipse E600 dotato di camera digitale DXM1200 (Nikon, Tokio, Japan).

### 9.3 Test del micronucleo (MN)

Il test dei micronuclei è un test di mutagenesi che permette di individuare gravi rotture al DNA come danni cromosomici o al fuso mitotico. Infatti, i frammenti di DNA originati sia da SSBs che da DSBs che non sono stati incorporati nel nucleo durante la mitosi, formano dei corpuscoli extracellulari, morfologicamente uguali al nucleo ma più piccoli: i micronuclei. La determinazione della frequenza dei micronuclei rappresenta un indicatore diretto di danno cromosomico, risultato di mutazioni non riparabili o da saturazione del meccanismo di riparazione del materiale genetico. I micronuclei si formano tra la metafase e l'anafase, motivo per cui il test è effettuato il giorno dopo il trattamento con raggi UV.

La metodica utilizzata (*Bryce SM et al, 2007*) prevede una lettura in citofluorimetria e l'utilizzo di due fluorofori aggiunti in maniera sequenziale, il SYTOX® Green (Life Technologies™) e lo ioduro di propidio (Sigma-Aldrich). Quest'ultimo va a legarsi al DNA di cellule morte o in media e tarda apoptosi, poichè non può entrare nelle cellule vitali che sono ancora integre. Successivamente viene utilizzato il SYTOX® Green che viene aggiunto insieme alle soluzioni di lisi  $1^{10}$  e  $2^{11}$  e quindi è in grado di legarsi anche al DNA di cellule che erano vitali. Ne segue che le cellule che risulteranno marcate sia con propidio che con SYTOX® Green sono quelle morte o in media-tarda apoptosi, mentre i nuclei e i micronuclei di cellule intatte sono marcati unicamente con SYTOX® Green. Vengono ritenuti micronuclei gli eventi che emettono una fluorescenza di 1/100 - 1/10 di quella di un nucleo intatto ( $2n$ ) (*Avlasevich SL et al, 2006*). Infine sono state utilizzate delle microsfere (Beads) di polistirene fluorescenti, di 6 µm di diametro (Life Technologies™) al fine di valutare la citotossicità della sostanza in esame evitando così di sovrastimare il danno rilevato.

Le cellule NCTC-2544 e HaCaT sono coltivate in piastre Petri da 60 mm (Corning) in 3 ml di terreno completo. Dopo 24 h dalla fine dell'irradiazione, i campioni sono lavati con 2 ml di PBS (una volta per NCTC-2544, 3 volte per HaCaT) e staccate con la tripsina (Sigma) (300 µl per 5 minuti a 37°C per le NCTC-2544, 1 ml per 3 minuti a temperatura ambiente e successivamente 400 µl per 5 minuti a 37°C per HaCaT). Distaccate dalla piastra, sono riprese in 1 ml di terreno completo e centrifugate 5 minuti a 2000 rpm. Le cellule vengono quindi raccolte con un 1mL di PBS addizionato col 2% di siero fetale bovino (PBS+2% FBS) (FBS, Biochrom) e centrifugate a 2000 rpm per 5 minuti. Il surnatante viene aspirato ed il pellet è risospeso in 1 mL di PBS+2%

FBS. Si effettua la conta cellulare con il metodo del Trypan Blue (Sigma) in modo da individuare, per ogni campione, un volume in cui vi siano  $5 \times 10^5$  cellule/mL. Il volume calcolato viene prelevato e portato al volume di 1 mL con PBS+2% FBS. I campioni vengono quindi centrifugati a 2000 rpm per 5 minuti, il surnatante viene aspirato e si aggiungono ad ogni campione 300  $\mu$ L di ioduro di propidio (Sigma-Aldrich) 2  $\mu$ g/mL in PBS e si lascia incubare per 10 minuti a temperatura ambiente e al riparo dalla luce. Finita l'incubazione si centrifugano i campioni a 2000 rpm per 5 minuti e si aspira il surnatante per poi effettuare un lavaggio con 1 mL di PBS+2% FBS. Al termine del lavaggio si aspira il surnatante in modo tale da lasciarne circa 50  $\mu$ L che coprano il pellet e si lascia riposare al buio per 30 minuti, a temperatura ambiente. Vengono poi aggiunti 500  $\mu$ L di soluzione di lisi 1<sup>10</sup> ad ogni campione, si agita delicatamente e si lascia incubare a temperatura ambiente per 1 ora, al riparo dalla luce. Infine vengono aggiunti 500  $\mu$ L di soluzione di lisi 2<sup>11</sup> ad ogni campione e si lascia nuovamente incubare a temperatura ambiente per almeno 30 minuti, sempre al riparo dalla luce. Si trasferiscono i campioni in tubi da FACS e si effettua la lettura al citofluorimetro (FACScalibur Becton Dickinson, laser ad Argon 488) alla lunghezza d'onda di eccitazione di 504 nm e di emissione di 523 nm per il SYTOX® Green, e alla lunghezza d'onda di eccitazione di 535 nm e di emissione di 617 nm per lo ioduro di propidio. Le beads vengono eccitate ad una lunghezza d'onda di 505 nm ed emettono a 515 nm. Il numero di micronuclei viene espresso come volte di incremento (Fold Increase) rispetto al controllo.

<sup>10</sup> Soluzione lisi 1: 0.584 mg/ml di NaCl (Sigma-Aldrich), 1.13 mg/ml di Na citrato (Sigma-Aldrich), 0.3  $\mu$ l/ml di IGEPAL (Sigma-Aldrich), 0.5 mg/ml di RNAsi (Sigma-Aldrich), 0.4  $\mu$ M SYTOX® Green (Life Technologies™).

<sup>11</sup> Soluzione lisi 2: 85.6 mg/ml di saccarosio (Sigma-Aldrich), 16.4 mg/ml di acido citrico (Sigma-Aldrich), 0.4  $\mu$ M SYTOX® Green (Life Technologies™), 1 goccia/mL di Beads (Life Technologies™).

Il test del micronucleo è eseguito anche sulle cellule estratte da epidermide di biopsie, seguendo lo stesso protocollo descritto per le due linee cellulari (*Reus AA et al, 2012*).



## **10. TEST DI VALUTAZIONE DELL'APOPTOSI**

### **10.1 Valutazione del potenziale di membrana mitocondriale (JC-1)**

Il JC-1 è un test che permette di valutare cambiamenti del potenziale di membrana del mitocondrio. In particolare, la perdita di potenziale è un evento precoce nel processo di apoptosi che precede la traslocazione della fosfatidilserina all'esterno della cellula e coincide con l'attivazione delle caspasi iniziatrici.

Il 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1) è un colorante lipofilico che, nelle cellule sane, entra nel citosol come monomero di colore verde e si accumula nel mitocondrio formando aggregati che assumono un colore rosso fluorescente. Questo avviene perché la carica negativa prodotta dal potenziale di membrana del mitocondrio permette al colorante JC-1, che porta una carica positiva, di entrare nel mitocondrio. In cellule apoptotiche o necrotiche, invece, la caduta di potenziale non permette l'entrata del colorante nel mitocondrio che quindi rimane in forma monomerică e conferisce al citoplasma un colore verde fluorescente. I risultati sono espressi come percentuale di cellule con potenziale di membrana alterato.

Per questo test si utilizza un kit (MitoProbe JC-1 Assay Kit, Invitrogen). Le cellule, coltivate in piastre Petri 60 mm (Corning), sono analizzate dopo 24 ore dalla fine dell'irradiazione. Dopo aver aspirato il terreno, i campioni vengono lavati con 2 ml di PBS e staccati con 300 µl di tripsina (Sigma) per NCTC-2544 a 37 °C per 5 minuti e 1 ml di tripsina a temperatura ambiente per 3 minuti e successivamente 400 µl a 37°C per 5 minuti per HaCaT. Una volta staccate dalla piastra, le cellule sono riprese in 1 ml di terreno e centrifugate per 5 minuti a 2000 rpm. Il pellet è risospeso in 1 ml di PBS+5% di FBS (Biochrom) e si fa la conta cellulare attraverso il metodo del Trypan Blue (Sigma) per avere 10<sup>6</sup> cellule/ml. I campioni sono nuovamente centrifugati, risospesi in 500 µl di soluzione di JC-1<sup>1</sup> e lasciati in incubatore a 37°C con i tappi aperti per 30 minuti. Il controllo negativo non colorato viene invece risospeso in 500 µl di soluzione fisiologica. Finita l'incubazione i campioni sono centrifugati 5 minuti a 2000 rpm, lavati con 1 ml di PBS+5%FBS (Biochrom), ricentrifugati ed infine risospesi in 1 ml di soluzione fisiologica (NaCl 0,9% in H<sub>2</sub>O distillata a pH=7) per permettere la lettura al citofluorimetro (FACScalibur

Becton Dickinson) alla lunghezza d'onda di eccitazione di 488 nm e lunghezza di emissione di 529 per la forma monomeric (verde) e di 590 per il JC-1 aggregato (rosso).

<sup>1</sup>Soluzione di JC-1: JC-1 in DMSO 200  $\mu$ M diluito 1:200 in soluzione fisiologica NaCl 0,9% in H<sub>2</sub>O distillata a pH=7

## 10.2 Test dell'Annessina V (*in vitro* ed *ex vivo*)

Il processo apoptotico è studiato mediante il test dell'Annessina V che permette di individuare le cellule apoptotiche (sia in fase precoce che tardiva) e necrotiche. Il fosfolipide fosfatidilserina (PS), che di norma si trova nella membrana cellulare interna, durante l'apoptosi viene traslocato all'esterno. L'annessina V è una proteina di 36 KDa, Ca<sup>2+</sup> dipendente che ha elevata affinità per la PS ed è legata ad un fluoroforo.

Per questo test si utilizza un kit (Alexa Fluor 488 Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit, Invitrogen). Le cellule vengono coltivate in piastre Petri 60 mm (Corning) in terreno completo e l'esperimento è effettuato 24 ore dopo la fine dell'irradiazione. Dopo aver raccolto il surnatante (perché potrebbe contenere cellule apoptotiche o necrotiche che si sono staccate dalla piastra) si lavano le cellule con 2 ml di PBS (una volta per NCTC-2544, 3 volte per HaCaT), si staccano dalla piastra con tripsina (Sigma) (300  $\mu$ l per 5 minuti a 37°C per NCTC-2544, 1 ml per 3 minuti a temperatura ambiente e poi 400  $\mu$ l per 5 minuti a 37°C per HaCaT), si riprendono in 1 ml del surnatante corrispettivo e si centrifugano per 5 minuti a 2000 rpm. Il pellet è risospeso in 1 ml di PBS+5%FBS e per ogni campione si effettua la conta cellulare con il metodo del Trypan Blue (Sigma) per ottenere 10<sup>6</sup> cellule/ml. Dopo aver centrifugato di nuovo i campioni per 5 minuti a 2000 rpm si risospende il pellet in 100  $\mu$ l di Annexin Binding Buffer 5x (ABB) diluito 1:10 in Na-Citrato 0,1% in H<sub>2</sub>O distillata (tranne nel controllo negativo non colorato (C- PBS) e in quello colorato solo con propidio ioduro (C- P.I.), nei quali sono stati aggiunti 100  $\mu$ l di PBS). Si aggiungono 5  $\mu$ l di annessina V in tutti i campioni (tranne in C- PBS e C- P.I.) e 1  $\mu$ l di working solution (propidio ioduro sciolto 1:10 in ABB diluito 1:10 in Na-Citrato 0,1% in H<sub>2</sub>O distillata) (tranne nei campioni C- PBS e C- colorato solo con annessina V (C- ANX)). I campioni rimangono a temperatura ambiente per 15 minuti al riparo dalla luce. Al termine dell'incubazione si aggiungono 400  $\mu$ l di ABB 1:10 (mentre in C- PBS e C- P.I. 400  $\mu$ l di PBS) e i campioni sono letti al citofluorimetro (FACScalibur Becton Dickinson) alla lunghezza d'onda

di eccitazione di 496 nm e di emissione di 519 nm. I risultati vengono espressi come percentuale di cellule apoptotiche nel campione.

Il test dell'Annexina V è eseguito anche sulle cellule estratte da epidermide di biopsie, seguendo lo stesso protocollo descritto per le due linee cellulari.

## **11. ANALISI STATISTICA**

I risultati di ogni test sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard di almeno 3 esperimenti. Nel caso del Comet test, i risultati sono espressi come media delle mediane  $\pm$  deviazione standard di almeno 3 esperimenti.

L'analisi statistica dei dati è condotta utilizzando il software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc. California, USA). Sono utilizzati i seguenti test statistici: l'analisi One-Way Anova (Dunnett's post hoc test) e la Two-Way Anova (Bonferroni post hoc test).

# **RISULTATI**

## **1. TEST DI CITOTOSSICITA'**

### **1.1. Test di vitalità cellulare (MTT test, *in vitro*)**

La valutazione *in vitro* dell'effetto citotossico dei raggi UVA e UVB e l'azione protettiva di *Vaccinium Myrtillus*, timolo ed estratto di *Thymus Vulgaris L.* è stata effettuata utilizzando il test dell'MTT. Questo test si basa sulla riduzione, da parte dell'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi, del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) in sali di formazano che sono indicativi del numero di cellule vive e metabolicamente attive.

I valori vengono espressi come percentuale di vitalità rispetto al controllo negativo a cui si attribuisce il 100% di vitalità. L'MTT permette di individuare le dosi di UVA e UVB non citotossiche da utilizzare nei successivi test di genotossicità.

Per le dosi di UVA le cellule sono state sottoposte a tre dosi nel range 8-24 J/cm<sup>2</sup> mentre per gli UVB sono state testate dosi nel range 0.016-0.72 J/cm<sup>2</sup>. La scelta del range di dosi di irradiazione da testare si è basata su dosi di esposizione reale a cui la cute umana è giornalmente sottoposta. Le dosi di radiazioni ultraviolette e le concentrazioni di *Vaccinium Myrtillus*, timolo ed estratto di *Thymus Vulgaris L.* che non riducevano la vitalità oltre al 50% sono state considerate utilizzabili nei test di genotossicità. Il test è stato effettuato a t<sub>0</sub> (subito dopo la fine dei trattamenti) e a t<sub>24</sub> (dopo 24 ore dalla fine dei trattamenti). I dati che riporto in tesi sono quelli relativi al t<sub>24</sub>. I valori vengono espressi come percentuale di vitalità rispetto al controllo negativo (DMSO) a cui è attribuito il 100% di vitalità.

### **UVA**

Nella linea cellulare NCTC 2544, delle tre dosi di UVA testate, le due maggiori (16 e 24 J/cm<sup>2</sup>) hanno ridotto la vitalità in maniera statisticamente significativa e dose-dipendente (p<0.01 a 16 J/cm<sup>2</sup>; p<0.001 a 24 J/cm<sup>2</sup>) (Figura 12a). Tuttavia, poiché questa riduzione non ha superato il 20%, le dosi sono state utilizzate per i test di genotossicità.

L'esposizione della linea cellulare HaCaT ai raggi UVA ha invece determinato una riduzione statisticamente significativa della percentuale di cellule vitali solo alla dose massima testata ( $p < 0.05$  a  $24 \text{ J/cm}^2$ ) (Figura 13a). Anche in questo caso la riduzione di vitalità non ha superato il 20%, quindi le tre dosi testate sono state utilizzate per l'analisi genotossica.

## **UVB**

Esponendo la linea cellulare NCTC 2544 ai raggi UVB, è stata evidenziata una riduzione altamente significativa ( $p < 0.001$ ) della vitalità cellulare a tutte le dosi testate (Figura 12b).

La riduzione di vitalità delle cellule HaCaT risulta significativa solo a partire dalla dose  $0.032 \text{ J/cm}^2$  ( $p < 0.01$ ) come si può osservare in Figura 13b.

Per entrambi le linee cellulari, le dosi di raggi UVB testate sono risultate comunque utilizzabili per i test di genotossicità in quanto la riduzione della vitalità non ha superato in nessun caso il 50%. In particolare, per i test di genotossicità si è scelto di utilizzare le tre dosi minori ( $0.016$ - $0.024$ - $0.032 \text{ J/cm}^2$ ) poiché sono quelle che hanno mostrato vitalità maggiore anche al  $t_{24}$ . Poiché le dosi di irradiazione  $0.24$  e  $0.72 \text{ J/cm}^2$  hanno invece mostrato un'alta riduzione della vitalità a  $t_{24}$  queste sono state utilizzate solo per i test di stress ossidativo (effettuati a  $t_0$  in cui la vitalità a queste dosi di irradiazione era invariata).

## **VACCINIUM MYRTILLUS**

L'esposizione di NCTC 2544 e HaCaT a concentrazioni scalari di estratto di *Vaccinium Myrtillus* ( $40$ - $640 \text{ } \mu\text{g/mL}$ ) per 1 ora ha evidenziato una debolissima riduzione della vitalità cellulare dopo 24 ore dalla fine del trattamento (Figura 14a e Figura 15a).

## **TIMOLO**

Il trattamento delle due linee cellulari con concentrazioni scalari di timolo ( $0.125$ - $8 \text{ } \mu\text{g/mL}$ ;  $6.6$ - $52.8 \text{ } \mu\text{M}$ ) per 1 ora non ha prodotto diminuzione statisticamente significativa della vitalità cellulare dopo 24 ore dalla fine del trattamento (Figura 14b e Figura 15b).

## **ESTRATTO DI *Thymus Vulgaris L.***

Il trattamento di NCTC 2544 per 1 ora con concentrazioni scalari di estratto di *Thymus Vulgaris L.* (1.82-14.69 µg/mL) ha prodotto, dopo 24 ore dalla fine del trattamento, una diminuzione di vitalità statisticamente significativa ( $p < 0.001$ ) alle due concentrazioni maggiori (Figura 14c). Nonostante il risultato dell'analisi statistica le concentrazioni risultano tutte utilizzabili in quanto la riduzione di vitalità cellulare non supera mai il 35-40%.

Le cellule HaCaT trattate per 1 ora con concentrazioni scalari di estratto di *Thymus Vulgaris L.* (0.22-14.69 µg/mL) hanno mostrato solo una lieve e non statisticamente significativa riduzione della vitalità a tutte le concentrazioni (Figura 15c).

### **1.2 Test di danno tissutale (LDH Activity Test, *ex vivo*)**

Il test di valutazione del danno tissutale è stato effettuato per conoscere gli effetti delle dosi di UVA e UVB sulla permeabilità di membrana. Per quanto riguarda i raggi UVA le biopsie sono state sottoposte a due dosi (16 e 24 J/cm<sup>2</sup>) mentre per gli UVB sono state testate le dosi 0.24 e 0.72 J/cm<sup>2</sup>. Il test è stato effettuato sul surnatante dei campioni prelevato 1 ora dopo la fine dell'irradiazione con UVA o UVB. I valori di attività dell'enzima LDH vengono espressi come milliunità/mL, in cui una unità di attività di LDH è definita come la quantità di enzima che catalizza la conversione di lattato in piruvato per generare 1µmole di NADH al minuto a 37°C.

#### **UVA**

Nessuna dose di UVA ha aumentato in modo significativo il rilascio di LDH da parte delle cellule delle biopsie cutanee come si può osservare in Figura 16a.

#### **UVB**

Il trattamento delle biopsie con diverse dosi di UVB ha provocato un aumento significativo ( $p < 0.001$ ) del rilascio di LDH da parte del tessuto solo alla dose più alta testata (Figura 16b). Il pretrattamento delle biopsie con timolo ed estratto di *Thymus Vulgaris L.* ha ridotto in maniera statisticamente significativa ( $p < 0.001$ ) il rilascio dell'enzima.

## **2. ANALISI MORFOLOGICA DELLE SEZIONI DI CUTE UMANA**

### **2.1 Colorazione con Ematossilina-Eosina**

La colorazione con Ematossilina-Eosina è una colorazione bicromica che rivela i vari tessuti e organelli costituenti la cellula grazie al loro diverso valore di pH. Il nucleo e i vari componenti acidi del citoplasma (ribosomi, secreti acidi) vengono colorati in viola dall'ematossilina, che è un colorante basico, invece il citoplasma e gli altri tessuti basici (tessuto muscolare, connettivo, osseo) vengono colorati in rosa, più o meno intenso.

Tutti i campioni di cute umana colorati con Ematossilina-Eosina hanno evidenziato sia la struttura tridimensionale delle sezioni in esame che la continuità tra epidermide e derma sottostante. Infatti, nei campioni controllo (CTRL, Timolo ed estratto di *Thymus Vulgaris L.*) sono presenti: cheratinociti di forma cilindrica nello strato basale, un compartimento spinoso pluri-stratificato a livello intermedio, successivamente uno strato granulare ed infine lo strato corneo nello strato più esterno.

Come indicato in Figura 17a, l'irradiazione delle biopsie con UVA (16-24 J/cm<sup>2</sup>) provoca solo delle deboli variazioni morfologiche, quali la condensazione nucleare in tutti gli strati dell'epidermide.

I campioni esposti alla dose più bassa di UVB (0.24 J/cm<sup>2</sup>) sono comparabili al controllo non irradiato; al contrario, l'irradiazione con la dose più alta (0.72 J/cm<sup>2</sup>) induce marcate alterazioni morfologiche caratterizzate da aumento degli spazi intercellulari in tutti gli strati epidermici e da forte condensazione nucleare negli strati soprabasali (Figura 17b). Questi tipi di danni sono stati notevolmente ridotti dal pretrattamento con timolo. La stessa capacità protettiva non è stata evidenziata nei campioni pretrattati con estratto di *Thymus Vulgaris L.* e successivamente esposti ad irradiazione con UVB (Figura 18a, b, c).

### **2.2 Analisi della proliferazione cellulare mediante saggio con 5'-Bromo-2'-deossiuridina**

La variazione di capacità proliferativa delle cellule epidermiche esposte ad irradiazione è stata valutata mediante il saggio con BrDU. Il test sfrutta la capacità del nucleotide BrDU di intercalarsi nel DNA durante la fase mitotica al posto della timidina perché suo analogo. Quindi, in seguito ad incubazione con BrDU, le cellule che stanno sintetizzando DNA (fase S del ciclo)

incorporeranno BrdU al posto della timidina nel loro DNA. Tali cellule possono essere identificate utilizzando un anticorpo Anti-BrdU, in grado di riconoscere specificatamente BrdU ma non timidina. La percentuale di cellule nella fase S del ciclo è stata determinata usando microscopia a fluorescenza.

L'immonopositività a BrDU è localizzata a livello nucleare nello strato basale epidermico. L'analisi quantitativa dell'incorporazione di BrDU dimostra che sia gli UVA che gli UVB inducono un'immediata e statisticamente significativa ( $p < 0.001$ ) riduzione della proliferazione dei cheratinociti, rispetto ai propri controlli, 24 ore dopo la fine dell'irradiazione (Figura 19a e Figura 19b). L'irradiazione con UVA non determina alcuna variazione significativa di proliferazione cellulare tra le due dosi testate (Figura 19a).

Al contrario, l'irradiazione delle biopsie con raggi UVB evidenzia una diminuzione dose dipendente della proliferazione cellulare (Figura 19b). L'incremento statisticamente significativo ( $p < 0.05$ ) del numero di cellule proliferanti è rilevato solo in biopsie pretrattate con timolo e successivamente esposte alla massima dose di UVB utilizzata ( $0.72 \text{ J/cm}^2$ ) (Figura 19b).

### **3. ANALISI DEL CICLO CELLULARE**

L'analisi del ciclo cellulare è stata effettuata con lo scopo di avere ulteriori informazioni riguardo l'effetto dei raggi UVA e UVB sulla distribuzione cellulare nelle diverse fasi del ciclo. L'esperimento è stato riprodotto sia *in vitro* che su campioni biotici, irradiati esclusivamente con raggi UVB.

#### **3.1 Analisi del ciclo cellulare (*in vitro*)**

##### **UVA**

Per effettuare l'analisi del ciclo cellulare in seguito a irradiazione con UVA, le cellule NCTC 2544 e HaCaT sono state sottoposte alle dosi di irradiazione che hanno provocato, in seguito alla valutazione con test dell'MTT, diminuzione maggiore della vitalità ( $16$  e  $24 \text{ J/cm}^2$ ).

L'analisi del ciclo della linea NCTC 2544 ha mostrato che entrambe le dosi di UVA provocano un'alterazione nella corretta progressione del ciclo cellulare rispetto al controllo negativo



(CTRL) (Figura 20a). Le cellule presenti in fase  $G_0/G_1$  diminuiscono drasticamente già alla dose di irradiazione di  $16 \text{ J/cm}^2$  e parallelamente aumentano le cellule presenti in fase di sintesi del DNA in entrambi le dosi. Le cellule esposte alla dose  $24 \text{ J/cm}^2$  evidenziano, oltre ad un blocco in fase S (aumento della percentuale di cellule in questa fase), anche un aumento del numero di cellule in fase Sub- $G_1$ .

Osservando la Figura 22a, si evince che l'esposizione della linea cellulare HaCaT ai raggi UVA determina un'alterazione della progressione del normale ciclo cellulare rispetto al controllo negativo (CTRL). Si può notare, infatti, che tutte e due le dosi di UVA utilizzate nel test causano un aumento della percentuale di cellule in fase S, parallelo ad una diminuzione del quantitativo di cellule distribuite in fase  $G_0/G_1$ . Anche nelle cellule HaCaT irradiate con  $24 \text{ J/cm}^2$ , come nella linea NCTC 2544, è evidente un aumento della percentuale di cellule in fase Sub- $G_1$  parallelo al blocco in fase S.

## **UVB**

L'analisi del ciclo cellulare delle linee cellulari NCTC 2544 e HaCaT irradiate con UVB è stata effettuata utilizzando le dosi che, in base ai risultati ottenuti con MTT test, si è scelto di utilizzare per i test di genotossicità ( $0.016-0.024-0.032 \text{ J/cm}^2$ ).

L'irradiazione delle cellule NCTC 2544 con UVB mostra un'alterazione del ciclo cellulare rispetto al controllo negativo (CTRL) (Figura 21b). In tutte le dosi testate si ha una diminuzione della percentuale di cellule presenti in fase  $G_0/G_1$ , parallela ad un incremento di percentuale di cellule in fase S e Sub- $G_1$ . È evidente che il blocco delle cellule in fase S sia inversamente proporzionale alle dosi di UVB; contrariamente all'incremento di percentuale in Sub- $G_1$  che risulta essere dose dipendente.

Anche l'analisi del ciclo cellulare della linea HaCaT (Figura 23b) evidenzia un'alterazione della normale distribuzione cellulare a seguito di irradiazione con UVB. È evidente una diminuzione della percentuale di cellule in fase  $G_0/G_1$ , parallela ad un aumento dose dipendente del numero di cellule in Sub- $G_1$ . Osservando la Figura 21b, inoltre, è riscontrabile un blocco in fase S solo in cellule irradiate con la dose minore di UVB, a cui segue un lieve incremento della fase Sub- $G_1$ .

### **3.2 Analisi del ciclo cellulare (*ex vivo*)**

L'analisi del ciclo cellulare di cellule estratte da biopsie di cute umana ed esposte a raggi UVB (0.24-0.72 J/cm<sup>2</sup>) ha evidenziato la capacità dei suddetti raggi di alterare la normale distribuzione cellulare. Osservando la Figura 24 è possibile notare che vi sia un decremento della percentuale di cellule in fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, corrispondente ad un aumento dose dipendente del numero di cellule in Sub-G<sub>1</sub>.

## **4. VALUTAZIONE DELLO STATO DI OSSIDAZIONE CELLULARE (*in vitro*)**

### **4.1 Valutazione della quantità intracellulare di ROS**

La formazione di ROS è stata misurata tramite la lettura della fluorescenza emessa dalla sonda 2',7'-diclorofluoresceina diacetato (DCFH-DA) in seguito alla reazione con le specie reattive dell'ossigeno presenti in cellula. I valori di fluorescenza sono stati normalizzati sul quantitativo proteico ed espressi come percentuale rispetto al controllo negativo (PBS) al quale viene attribuita una percentuale di produzione di ROS del 100%.

La scelta della concentrazione di *Vaccinium Myrtillus* e timolo da utilizzare è stata determinata anche dalla necessità di non avere un effetto pro-ossidante. Come indicato in letteratura infatti molte sostanze notoriamente antiossidanti possono avere, a dosi elevate, un effetto pro-ossidante (*Halliwell et al., 2005*). Per evitare un effetto pro-ossidante delle due sostanze è stato effettuato, in tutte e due le linee cellulari, un test per valutare la quantità di specie reattive dell'ossigeno in seguito al trattamento per 1 ora con le stesse concentrazioni di *Vaccinium Myrtillus* e timolo valutate nel test di citotossicità. Il test ha indicato, in entrambi le linee cellulari, che la concentrazione di *Vaccinium Myrtillus* pari a 320 µg/mL è quella capace di provocare la produzione della minor quantità di ROS (Figura 25a e Figura 26a). I risultati ottenuti nel test hanno inoltre evidenziato un lieve effetto pro-ossidante a concentrazioni di timolo superiori a 4µg/mL (Figura 25b e Figura 26b). In seguito a questa valutazione e a quella effettuata con il test di citotossicità si è scelto di usare per il *Vaccinium Myrtillus* la concentrazione 320 µg/mL e per il timolo la concentrazione di 1µg/mL (6.6µM).

## UVA

Nella linea cellulare NCTC 2544 l'aumento di ROS è rilevabile e statisticamente significativo alle due dosi maggiori di UVA testate ( $p < 0.001$ ). A queste dosi è stato inoltre riscontrato un marcato effetto protettivo da parte del *Vaccinium Myrtillus* ( $p < 0.001$  a  $16 \text{ J/cm}^2$ ,  $p < 0.01$  a  $24 \text{ J/cm}^2$ ), ma anche da parte di timolo e dell'estratto di *Thymus Vulgaris L*, anche se non in maniera significativa (Figura 27a).

La linea cellulare HaCaT evidenzia una minore produzione di ROS rispetto alle cellule NCTC 2544 dopo irradiazione con le stesse dosi di UVA. L'incremento significativo è comunque visibile nelle dosi maggiori ( $p < 0.001$ ). L'azione protettiva di *Vaccinium Myrtillus* è osservata in ogni dose di irradiazione, ma risulta significativa solo alla maggiore  $24 \text{ J/cm}^2$  ( $p < 0.001$ ). Anche il pretrattamento delle cellule HaCaT con timolo ed estratto di *Thymus Vulgaris L* ha evidenziato una significativa capacità protettiva delle due sostanze nei confronti di questo tipo di danno (timolo:  $p < 0.01$  a  $16 \text{ J/cm}^2$ , estratto:  $p < 0.01$  a  $16 \text{ J/cm}^2$  e  $p < 0.001$  a  $24 \text{ J/cm}^2$ ) (Figura 28a).

## UVB

Tutte le dosi di UVB testate sono in grado di aumentare la quantità di specie reattive dell'ossigeno in maniera statisticamente significativa ( $p < 0.001$ ) in cellule NCTC 2544. Le dosi di irradiazione inferiori alla  $0.064 \text{ J/cm}^2$  non hanno evidenziato alcun incremento di produzione di ROS. Mentre il pretrattamento di NCTC 2544 con *Vaccinium Myrtillus* sembra non esser in grado di ridurre le specie reattive dell'ossigeno indotte da UVB, il timolo recupera in maniera statisticamente significativa ( $p < 0.05$  a  $0.064 \text{ J/cm}^2$ ,  $p < 0.01$  a  $0.72 \text{ J/cm}^2$ ) il danno ossidativo indotto da UVB. E' stata riscontrata una lieve capacità protettiva (non significativa) nei confronti del danno causato da entrambi le dosi di UVB da parte dell'estratto di *Thymus Vulgaris L*. (Figura 27b).

Come mostrato nella Figura 28b, l'irradiazione della linea cellulare HaCaT con UVB comporta un significativo aumento della produzione di ROS ( $p < 0.001$ ) solo al tempo di irradiazione maggiore. Il pretrattamento con *Vaccinium Myrtillus* non ha alcun effetto sulla produzione di ROS. Il pretrattamento delle cellule con timolo riduce in maniera significativa il danno solo alla dose maggiore testata  $0.72 \text{ J/cm}^2$  ( $p < 0.05$ ). Al contrario, il pretrattamento con l'estratto di

*Thymus Vulgaris L.* riduce lievemente e in maniera non significativa la produzione di ROS nelle cellule HaCaT.

#### **4.2 Valutazione della lipoperossidazione**

La quantificazione della lipoperossidazione permette la valutazione del danno di tipo ossidativo nei confronti dei componenti della membrana cellulare. Mediante utilizzo dell'acido tiobarbiturico, viene misurata la quantità di malondialdeide (MDA) prodotta dalla degradazione degli acidi grassi in presenza di varie specie radicaliche. La malondialdeide reagendo con l'acido tiobarbiturico origina un composto fluorescente. I dati di fluorescenza rilevati sono stati normalizzati sul quantitativo proteico, interpolati su una curva standard di MDA ed espressi come  $\mu\text{moli}$  di MDA per milligrammo di proteine.

#### **UVA**

L'irradiazione della linea NCTC 2455 con UVA determina un aumento dose-dipendente di lipoperossidazione (Figura 29a). La quantità di malondialdeide prodotta è statisticamente significativa con  $p < 0.001$  alla dose di irradiazione di  $16 \text{ J/cm}^2$  e  $24 \text{ J/cm}^2$ . Il pretrattamento con *Vaccinium Myrtillus* è in grado di ridurre debolmente la quantità di MDA prodotta, ma mai in maniera statisticamente. Al contrario, sia il pretrattamento con il timolo che con l'estratto di *Thymus Vulgaris L.* sono in grado di dare una protezione significativa da questo tipo di danno con  $p < 0.01$  alla dose di irradiazione di  $16 \text{ J/cm}^2$  e  $p < 0.001$  alla dose di irradiazione di  $24 \text{ J/cm}^2$ .

Come evidenziato in Figura 30a, l'esposizione della linea cellulare HaCaT ai raggi UVA non determina, in nessuna dose utilizzata, un incremento dei livelli intracellulari di MDA prodotta. I pretrattamenti con le tre sostanze in esame non alterano i risultati ottenuti.

#### **UVB**

In seguito ad irradiazione con UVB della linea NCTC 2544 è stato riscontrato un aumento significativo ( $p < 0.01$ ) nella produzione di malondialdeide solo alla dose di irradiazione più alta ( $0.72 \text{ J/cm}^2$ ) con un effetto protettivo non significativo solo da parte di estratto di *Thymus Vulgaris L.* (Figura 29b).

L'irradiazione delle cellule HaCaT con i raggi UVB non determina, in nessuna dose utilizzata, un incremento dei livelli intracellulari di MDA prodotta. I pretrattamenti delle cellule con *Vaccinium Myrtillus*, timolo ed estratto di *Thymus Vulgaris L.* non inducono alcuna variazione dei risultati ottenuti (Figura 30b).

## **5. TEST DI GENOTOSSICITA'**

### **5.1 Comet test alcalino (pH>13, *in vitro*)**

Il test del Comet alcalino consente di misurare il danno al DNA in singole cellule, dopo 24 ore dal trattamento, come rotture al singolo ed al doppio filamento. Il danno è stato misurato classificando i singoli nucleoidi in base alla morfologia che assumono (A, B, C, D, E) in seguito a corsa elettroforetica. La classificazione dei nucleoidi è espressa come percentuale sul totale dei nucleoidi analizzati. Un'ulteriore quantificazione del danno è stata fatta tramite un programma di elaborazione dell'immagine che fornisce parametri quali la lunghezza della coda (tail length,  $\mu\text{m}$ ), la percentuale di DNA nella coda (%DNA) ed il tail moment ( $\mu\text{m}$ ), che è il prodotto dei due parametri precedenti. L'incremento di questi tre parametri rispetto al controllo negativo (DMSO) è indice di danno. I dati presentati sono solo relativi al parametro maggiormente significativo: % DNA nella coda.

### **UVA**

L'esposizione della linea cellulare NCTC 2544 a raggi UVA è in grado di indurre un lieve, ma statisticamente significativo ( $p < 0.05$  a  $16 \text{ J/cm}^2$ ,  $p < 0.01$  a  $24 \text{ J/cm}^2$ ) danno genotossico. Il pretrattamento delle cellule con le tre sostanze in esame non determina alcuna variazione del parametro genotossico analizzato, come si può osservare in Figura 31a.

L'irradiazione con raggi UVA della linea cellulare HaCaT non evidenzia alcun danno al DNA e i pretrattamenti delle cellule con le tre sostanze testate non variano i risultati ottenuti. (Figura 32a)

### **UVB**

L'irradiazione della linea cellulare NCTC 2544 con raggi UVB è in grado di indurre un danno genotossico maggiore e dose-dipendente rispetto all'irradiazione con UVA. Il trattamento con

UVB produce inoltre un aumento dei parametri genotossici analizzati tramite software, soprattutto del parametro % di DNA nella coda. L'aumento di quest'ultimo risulta significativo alle dosi più alte di UVB utilizzate in questo test con  $p < 0.001$  a  $0.024 \text{ J/cm}^2$  e  $0.032 \text{ J/cm}^2$  (Figura 31b). Il valore di percentuale di DNA nella coda, non è diminuito dal pretrattamento con *Vaccinium Myrtillus*, ma viene ridotto in modo statisticamente significativo ( $p < 0.05$ ) da parte di timolo alla dose  $0.024 \text{ J/cm}^2$ , e dal pretrattamento con *Thymus Vulgaris L.* sia alla dose  $0.024 \text{ J/cm}^2$  ( $p < 0.001$ ) che alla dose  $0.032 \text{ J/cm}^2$  ( $p < 0.01$ ).

L'esposizione delle cellule HaCaT ai raggi UVB causa un aumento statisticamente significativo ( $p < 0.001$ ) del danno al DNA delle cellule in ogni dose testata (Figura 32b). L'efficacia protettiva del *Vaccinium Myrtillus* è evidente ( $p < 0.001$ ) a partire dalla dose intermedia  $0.24 \text{ J/cm}^2$ . Anche il pretrattamento delle cellule con timolo evidenzia la capacità protettiva della sostanza alle stesse dosi e con la stessa significatività ( $p < 0.001$ ). La protezione nei confronti di questo danno da parte del pretrattamento con *Thymus Vulgaris L.* è evidente soltanto nella dose intermedia  $0.24 \text{ J/cm}^2$  ( $p < 0.001$ ).

## **5.2 Comet test alcalino (pH>13, ex vivo)**

### **UVA**

Dall'osservazione della Figura 33a, si evince che l'irradiazione delle biopsie di cute umana con raggi UVA non ha prodotto danno genotossico statisticamente significativo nonostante siano state riscontrate variazioni rispetto al controllo negativo nel parametro analizzato.

### **UVB**

Il danno genotossico, valutato mediante il parametro percentuale di DNA nella coda, di biopsie di cute umana esposte a raggi UVB ha mostrato un danno maggiormente evidente alla dose più alta applicata ( $p < 0.01$  a  $0.72 \text{ J/cm}^2$ ) (Figura 33b). Il pretrattamento con timolo e con estratto di *Thymus Vulgaris L.* ha mostrato una capacità protettiva debole e non significativa.

## **5.3 Test dell'istone H2AX fosforilato ( $\gamma$ -H2AX)**

Il test dell'istone H2AX consente di individuare rotture al doppio filamento (DSBs) ed è stato utilizzato negli esperimenti condotti in entrambi i modelli come marker predittivo della formazione di micronuclei. La presenza di una rottura al doppio filamento è indicata dalla

presenza di fosforilazione dell'istone H2AX e viene definita *focus* (facilmente visualizzabile al microscopio confocale o immunofluorescenza).

### 5.3.1 Test dell'istone H2AX fosforilato ( $\gamma$ H2AX, *in vitro*)

L'analisi del danno viene effettuata classificando ciascuna cellula in una fascia di danno: cellule che presentano da 0 a 5 *foci* (assenza di danno), cellule che presentano da 6 a 10 *foci* (danno intermedio) ed infine cellule con più di 10 *foci* (danno esteso). I risultati sono espressi come percentuale di cellule in ciascuna fascia.

#### UVA

Per valutare la formazione delle DSBs a seguito di irradiazione con UVA è stata scelta solo la dose 24 J/cm<sup>2</sup> in quanto in base ai risultati del Comet test risulta essere la dose che induce il maggiore danno genotossico.

L'esposizione della linea cellulare NCTC 2544 a questa dose di UVA ha mostrato un aumento statisticamente significativo di rotture al doppio filamento rispetto al controllo (Figura 34). L'aumento di DSBs è stato riscontrato attraverso un aumento statisticamente significativo ( $p < 0.001$ ) della percentuale di cellule con più di 10 *foci* (Figura 34c) che si riflette in una diminuzione altrettanto significativa ( $p < 0.001$ ) delle cellule con 0-5 *foci* (Figura 34a). Il pretrattamento con *Vaccinium Myrtillus*, timolo ed estratto di *Thymus Vulgaris L.* non mostrano capacità protettiva nei confronti di questo tipo di danno.

L'irradiazione delle cellule HaCaT con la dose 24 J/cm<sup>2</sup> di UVA evidenzia un incremento della percentuale di cellule con rotture al doppio filamento del DNA. Dall'osservazione della Figura 36 si evince che l'incremento del danno (DSBs) è statisticamente significativo. Si nota come ad un decremento significativo di percentuale di cellule con 0-5 *foci* ( $p < 0.001$ , Figura 36a) corrisponda un altrettanto significativo aumento della percentuale di cellule con  $>10$  *foci* ( $p < 0.05$ , Figura 36c). Il pretrattamento della linea cellulare HaCaT con *Vaccinium Myrtillus*, timolo ed estratto di *Thymus Vulgaris L.* non mostrano capacità protettiva nei confronti di questo tipo di danno.

## UVB

L'irradiazione delle cellule NCTC 2544 con UVB ha provocato un aumento di DSBs statisticamente significativo rispetto al controllo negativo a tutte le dosi di irradiazione testate. Ogni dose di UVB ha portato ad una diminuzione statisticamente significativa ( $p < 0.001$ ) rispetto al controllo negativo della percentuale di cellule con 0-5 *foci* (Figura 35a) e un aumento altrettanto significativo ( $p < 0.001$ ) della percentuale di cellule con 6-10 e più di 10 *foci* (Figura 35c). Il pretrattamento con *Vaccinium Myrtillus*, timolo ed estratto di *Thymus Vulgaris L.* non ha mostrato effetto protettivo nei confronti del danno indotto da UVB.

I risultati riportati in Figura 37 evidenziano che l'esposizione della linea cellulare HaCaT ai raggi UVB induce, in ogni dose testata, un incremento significativo della percentuale di cellule con DSBs. L'irradiazione, infatti, causa un decremento significativo ( $p < 0.001$ ) di cellule con 0-5 *foci* (Figura 37a), corrispondente ad un incremento significativo di cellule con  $>10$  *foci* ( $p < 0.01$  a  $0.016$  e  $0.024$   $J/cm^2$ ;  $p < 0.001$  a  $0.032$   $J/cm^2$ , Figura 37c). Il pretrattamento cellulare con le tre sostanze in esame determina una lieve e non significativa riduzione del danno. Si può infatti osservare solo un debole incremento del numero di cellule con 0-5 *foci* e un decremento di cellule con  $>10$  *foci* in ogni dose testata.

### 5.3.2 Test dell'istone H2AX fosforilato ( $\gamma$ H2AX) su sezioni in paraffina (*ex vivo*)

Come si può osservare in Figura 38a e Figura 38b, i campioni controllo non presentano alcuna immunopositività, presente, invece, a livello nucleare in tutti i campioni irradiati.

L'irradiazione dei campioni biotici con raggi UVA ha indotto la formazione di un numero esiguo di foci positivi all'anticorpo anti-H2AX localizzati esclusivamente nello strato basale dell'epidermide (Figura 38a).

L'esposizione delle biopsie alla dose  $0.24$   $J/cm^2$  di raggi UVB causa una immunopositività ad H2AX fosforilato che non risulta essere distribuita in maniera omogenea in tutti gli strati dell'epidermide. Invece, nei campioni esposti a  $0.72$   $J/cm^2$  quasi tutti i nuclei dei cheratinociti sono positivi alla colorazione (Figura 38b). Il pretrattamento con timolo dei campioni esposti a raggi UVB mostra la capacità protettiva della sostanza, rivelando un forte decremento della



quantità di foci con DSBs in tutte e due le dosi testate (Figura 39b). Il test rivela anche una debole capacità protettiva dell'estratto di *Thymus Vulgaris L.* (Figura 39c).

#### **5.4 Test del micronucleo (MN)**

La frequenza di micronuclei è stata valutata come numero di volte di incremento (Fold Increase) rispetto al controllo negativo. Il campione viene considerato positivo al test dei micronuclei se questi sono in numero maggiore o uguale a tre volte il numero di micronuclei misurati nel controllo. A questo tipo di valutazione è stata comunque affiancata l'analisi statistica utilizzata in tutti gli altri test per la valutazione dell'effetto protettivo da parte di *Vaccinium Myrtillus*, timolo ed estratto di *Thymus Vulgaris L.*. Questo test prevede anche una ulteriore misura della vitalità cellulare ritenuta da alcuni autori più sensibile di quelle comunemente utilizzate. Questa metodica implica l'utilizzo di microsfere fluorescenti (Beads) che vengono sfruttate per misurare la vitalità cellulare dei campioni che vengono analizzati dal citofluorimetro durante il test dei micronuclei. Dunque la lettura con il FACS ha consentito di misurare contemporaneamente il numero di micronuclei e la vitalità cellulare in ogni campione analizzato. Questa valutazione è necessaria per non sovrastimare il numero di micronuclei e distinguere in maniera più efficace i campioni cellulari contenenti micronuclei da quelli che contengono DNA frammentato poiché hanno subito un processo apoptotico cercando così di evitare una sovrastima del danno genotossico.

##### **5.4.1 Test del micronucleo (MN, *in vitro*)**

Le dosi di irradiazione utilizzate nel test del micronucleo *in vitro* sono le stesse utilizzate nel test dell'istone H2AX che era stato appunto effettuato come test predittivo della formazione di micronuclei.

#### **UVA**

Il trattamento delle cellule NCTC 2544 e HaCaT con UVA (24 J/cm<sup>2</sup>) non ha indotto aumento di micronuclei rispetto al controllo negativo (Figura 40a Figura 41a). La vitalità cellulare dei campioni sottoposti ad irradiazione diminuisce rispetto al controllo negativo arrivando ad un valore del 45%. Questo valore seppure minore rispetto al controllo negativo permette di

considerare attendibile il risultato ottenuto nel test del micronucleo. Il pretrattamento con le tre sostanze in esame non ha variato il numero di micronuclei prodotti dai raggi UVA.

## UVB

Il trattamento delle cellule NCTC 2544 con UVB ha prodotto un aumento di micronuclei rispetto al controllo negativo a tutte le dosi (Figura 40b). L'analisi statistica effettuata con test One Way Anova (Dunnett's post hoc test) indica un aumento statisticamente significativo della produzione di micronuclei rispetto al controllo negativo a partire dalla dose intermedia di  $0.024 \text{ J/cm}^2$  ( $p < 0.05$ ) con un ulteriore aumento di significatività alla dose maggiore ( $p < 0.01$  a  $0.032 \text{ J/cm}^2$ ). Tuttavia il test viene considerato positivo solo alle dosi di irradiazione di  $0.024$  e  $0.032 \text{ J/cm}^2$  poiché solo a queste dosi il numero di micronuclei rilevati aumenta di più di tre volte rispetto al controllo negativo. La misura della vitalità cellulare mediante Beads ha mostrato che già alla dose più bassa di UVB si ha una drastica riduzione della vitalità cellulare i cui valori però permettono di ritenere validi i risultati del test del micronucleo. I pretrattamenti con *Vaccinium Myrtillus*, timolo e con estratto di *Thymus Vulgaris L.* risultano avere un lieve, ma non statisticamente significativo, effetto protettivo nei confronti di questo tipo di danno.

L'irradiazione della linea cellulare HaCaT con raggi UVB non ha evidenziato un aumento della produzione di micronuclei in nessuna dose testata (Figura 41b). L'analisi della vitalità cellulare realizzata mediante l'utilizzo delle Beads fluorescenti evidenzia una marcata diminuzione della vitalità cellulare, entro però il range di utilizzo. Il pretrattamento con le sostanze in esame non modifica questi risultati.

### 5.4.2 Test del micronucleo (MN, *ex vivo*)

L'irradiazione dei campioni biotici con raggi UVA ( $24 \text{ J/cm}^2$ ) e UVB ( $0.24-0.72 \text{ J/cm}^2$ ) non ha evidenziato alcun incremento nella produzione di micronuclei rispetto al controllo negativo non irradiato. Il pretrattamento con timolo ed estratto non ha evidenziato alcuna variazione in nessun campione come illustrato in Figura 42a e Figura 42b.

## **6. TEST DI VALUTAZIONE DELL'APOPTOSI**

### **6.1 Valutazione del potenziale di membrana mitocondriale (JC-1)**

Questo test permette di valutare modifiche del potenziale di membrana del mitocondrio. Il colorante 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1) si aggrega a formare un composto rosso fluorescente in cellule sane mentre rimane in forma monomeric (di colore verde fluorescente) in presenza di potenziale di membrana alterato. I valori riportati indicano la percentuale di cellule con potenziale di membrana depolarizzato.

Il pretrattamento delle linee cellulari NCTC 2544 e HaCaT con *Vaccinium Myrtillus*, timolo ed estratto di *Thymus Vulgaris L.* e la successiva irradiazione delle stesse con raggi UVA o UVB non determina alcuna significativa variazione del potenziale di membrana (Figura 43a e Figura 43b; Figura 44a e Figura 44b).

### **6.2 Test dell'Annessina V**

Questo test sfrutta la capacità della proteina annessina V di legare la fosfatidilserina (PS), un fosfolipide che viene traslocato all'esterno della membrana durante il processo apoptotico. I valori riportati in grafico sono espressi come percentuale di cellule apoptotiche presenti nel campione.

#### **6.2.1 Test dell'Annessina V (*in vitro*)**

##### **UVA**

Nella linea NCTC-2544 irradiata con raggi UVA non vi è alcun aumento della percentuale di cellule apoptotiche in tutte le dosi di irradiazione utilizzate. Il pretrattamento della linea cellulare con *Vaccinium Myrtillus*, timolo ed estratto di *Thymus Vulgaris L.* non causa alcun cambiamento nel numero di cellule apoptotiche (Figura 45a).

Anche per le cellule HaCaT non si evidenzia alcun incremento di percentuale di cellule apoptotiche dopo l'irradiazione con UVA. Il pretrattamento con *Vaccinium Myrtillus* non evidenzia alcuna variazione nella percentuale di apoptosi. E' stato riscontrato solo un debole

incremento dell'apoptosi in HacaT pretrattate con timolo ed estratto di *Thymus Vulgaris L.* e irradiate con la dose 24 J/cm<sup>2</sup> (Figura 46a)

## UVB

Nelle cellule NCTC-2544 vi è un aumento di cellule apoptotiche statisticamente molto significativo ( $p < 0.001$ ) evidente in tutte le dosi testate (0.016-0.032 J/cm<sup>2</sup>). I pretrattamenti con le tre sostanze in esame non variano la percentuale di cellule apoptotiche (Figura 45b).

L'aumento delle cellule apoptotiche nella linea HaCaT risulta essere dose dipendente e altamente significativo ( $p < 0.001$ ) per le due dosi maggiori di irradiazione (0.024-0.032 J/cm<sup>2</sup>) come indicato in Figura 46b. Il pretrattamento con *Vaccinium Myrtillus* non evidenzia la capacità protettiva della sostanza nei confronti di questo tipo di danno. Al contrario, l'esposizione delle cellule a timolo induce un significativo decremento ( $p < 0.001$ ) della percentuale di cellule apoptotiche alle stesse dosi (0.024-0.032 J/cm<sup>2</sup>). Anche il pretrattamento di HaCaT con estratto di *Thymus Vulgaris L.* riduce in maniera significativa l'apoptosi ( $p < 0.05$  a 0.024-J/cm<sup>2</sup>;  $p < 0.01$  a 0.032 J/cm<sup>2</sup>).

### 6.2.2 Test dell'Annexina V (*ex vivo*)

## UVB

Le cellule estratte da epidermide di cute umana e irradiate con raggi UVB (0.24-0.72 J/cm<sup>2</sup>) evidenziano un aumento statisticamente significativo della percentuale di cellule apoptotiche solo alla dose maggiore di UVB utilizzata ( $p < 0.05$ , 0.72 J/cm<sup>2</sup>) (Figura 47). Il pretrattamento dei campioni biotici con timolo induce alcuna variazione di questo tipo di danno. Al contrario, i campioni pretrattati con estratto di *Thymus Vulgaris L.* evidenziano un aumento statisticamente significativo ( $p < 0.001$ ) della percentuale di cellule apoptotiche in tutte e due le dosi di UVB testate.

## **DISCUSSIONE**

Uno dei maggiori fattori di rischio nell'insorgenza e nello sviluppo di patologie cutanee è l'esposizione alla radiazione ultravioletta, che costituisce circa il 5% delle radiazioni solari che raggiungono la superficie terrestre. A causa dell'aumento delle attività umane all'esterno e della riduzione dello strato di ozono che assorbe la maggior parte della radiazione UV, il numero di tumori alla pelle è notevolmente incrementato negli ultimi anni (*Moehrle M, 2008*).

Gli studi effettuati sulla correlazione tra l'esposizione alla luce solare e l'insorgenza di tumori cutanei hanno portato nel 2009 l'International Agency for Research on Cancer (IARC) a classificare le radiazioni solari tra i cancerogeni di Classe I. Le radiazioni ultraviolette verso cui molti autori hanno volto la loro attenzione sono essenzialmente gli UVA (315-400 nm) e gli UVB (280-315 nm), dato che gli UVC (100-280 nm) sono quasi completamente assorbiti dallo strato di ozono dell'atmosfera terrestre. Gli studi condotti sulle radiazioni ultraviolette sono stati effettuati principalmente su modelli *in vitro* ed hanno permesso di evidenziare numerose differenze tra i meccanismi d'azione che contraddistinguono ciascuna regione del campo ultravioletto. I raggi UVA compongono circa il 90-99% della radiazione ultravioletta che raggiunge la terra, il restante 1-10% è dato dai raggi UVB. UVA e UVB hanno un diverso grado di penetrazione cutanea in quanto i primi raggiungono gli strati più profondi della cute attraversando completamente il derma, al contrario degli UVB che giungono solo fino agli strati basali dell'epidermide (*Saliou C et al, 1999*). La differenza principale tra queste due componenti ultraviolette è il meccanismo attraverso cui esse provocano danno sulle macromolecole cellulari ed in modo particolare sul DNA. Infatti, la lunghezza d'onda tipica dei raggi ultravioletti A fa sì che vengano scarsamente assorbiti dalle macromolecole cellulari, inoltre, hanno un'energia troppo bassa per indurre in modo diretto la formazione di legami covalenti o rotture al DNA. Il meccanismo principale mediante il quale gli UVA esercitano danno passa attraverso l'azione di molecole presenti in cellula chiamate fotosensitizzatori, che, dopo aver assorbito l'energia degli UVA, aumentano la quantità di specie reattive dell'ossigeno. Queste ultime, a loro volta, sono capaci di danneggiare le componenti cellulari (*Cadet J and Douki T, 2011*). Le specie reattive dell'ossigeno alterano le strutture cellulari provocando reazioni a catena (come la perossidazione dei lipidi di membrana) e ossidando le basi del DNA (*Ikehata H and Ono T, 2011*). Il danno ossidativo più frequente alle basi del DNA è quello

che porta alla formazione di 8-idrossiguanina (8-oxo-G) (*Dizdaroglu M et al, 2002*). In particolare, lesioni ossidative alle basi della doppia elica portano a stadi precoci di cancerogenesi.

Le radiazioni ultraviolette di tipo B, nonostante siano presenti in quantità minori, sono considerate le più dannose e sono in grado di provocare lesioni genotossiche dirette. Questa capacità è data dal fatto che la loro energia viene completamente assorbita dalle macromolecole ed è tale da provocare la formazione di legami covalenti. Le lesioni più frequenti dovute all'azione dei raggi ultravioletti B sono la formazione di dimeri di pirimidina (CPD) e di 6-4 pirimidina-pirimidone fotoprodotti (*Ayala F et al, 2013*). Queste lesioni, se non riparate, portano alla formazione di mutazioni puntiformi ed in particolare a transizioni del tipo C→T. Molti studi hanno inoltre caratterizzato la differenza con cui le lesioni indotte dai due tipi di raggi vengono riparate dalle cellule. Il danno ossidativo indotto da UVA viene principalmente riparato per escissione di basi (BER) (*Kim KJ et al, 2002*) e contestualmente alla replicazione del materiale genetico. Infatti, le lesioni ossidative prodotte dagli UVA vengono trasformate in DSB durante il processo di replicazione (*Greinert R, 2012*), contemporaneamente a questo evento si ha arresto della forza replicativa e attivazione dei meccanismi di riparo. Nel sistema BER esiste una glicosilasi che riconosce specificamente la guanina ossidata (la 8oxoG DNA glicosilasi 1, OGG1) e taglia il legame glicosidico. Il risultante sito abasico, che potrebbe bloccare la replicazione o causare mutagenesi, viene processato da un'endonucleasi di classe II che taglia il legame fosfodiesterico al terminale 5' e recluta la polimerasi β che sintetizza DNA corretto. La OGG1 è maggiormente espressa negli strati esterni dell'epidermide rispetto allo strato basale (*Halliday GM et al, 2011*).

I prodotti derivati dalla diretta interazione dei raggi UVB con il DNA sono invece processati dal sistema di riparazione per escissione di nucleotidi (NER), che riconosce e ripara queste lesioni che distorcono la struttura della doppia elica. Il sistema NER può seguire due diversi pathway: il primo detto 'global genome repair' (GGR), che rimuove le lesioni dall'intero genoma e il secondo conosciuto come 'transcription coupled repair' (TCR), che ripara danni di geni attivamente trascritti. I due meccanismi si differenziano soprattutto nelle fasi iniziali di riconoscimento del danno, in particolare nel GGR questo processo è effettuato dalla proteina XPC. Questa proteina però non è in grado di riconoscere da sola lesioni come i fotoprodotti: esiste quindi un fattore, chiamato UV-damaged DNA binding (UV-DDB) complex, che ha alta capacità di legare e processare soprattutto i 6-4 PPs. È stato dimostrato in diversi studi che il complesso UV-DDB

favorisce il reclutamento di XPC sia ai CPD che ai 6-4 PPs e accelera la riparazione di queste lesioni (*Zhao Q et al, 2008*). È inoltre capace di interagire con CBP/p300, una famiglia di coattivatori trascrizionali che rimodellano la cromatina (grazie alla loro attività acetiltransferasica degli istoni) rendendo così accessibili i fotoprodotti alle proteine dei sistemi di riparo (*Pines A et al, 2009*).

I meccanismi di riparazione dei danni al DNA si attivano solo in seguito ad arresto del ciclo cellulare in fase G1, prima che la cellula si duplichi in fase S. Questo sistema è controllato dalla proteina oncosoppressore p53, un fattore trascrizionale che in presenza di danno al DNA trasloca nel nucleo per legarsi ai promotori di geni di proteine coinvolte nel ciclo cellulare, nel riparo del DNA e nell'apoptosi (nel caso in cui le lesioni siano molto gravi). L'induzione della morte cellulare serve a prevenire l'insorgenza di gravi mutazioni che possono portare a fenomeni di cancerogenesi (*Li G et al, 1998*).

Per proteggere la pelle vengono utilizzate creme solari che riparano principalmente dai raggi UVB. Esistono due categorie di protezioni solari: di tipo fisico (agenti inorganici) e di tipo chimico (agenti organici).

Le creme di tipo fisico contengono composti come ossido di zinco (ZnO) e diossido di titanio (TiO<sub>2</sub>) che sono in grado di disperdere, riflettere o assorbire l'irradiazione UV ma anche lo spettro del visibile e i raggi infrarossi. Questi prodotti, però, sono poco utilizzati perché visibili sulla pelle: solo recentemente, l'uso di processi di micronizzazione e incapsulamento ne ha migliorato la qualità. La diminuzione del diametro delle particelle, infatti, aumenta la trasparenza della crema e migliora la protezione dalle lunghezze d'onda più corte (quelle dei raggi UVB), che sono le più dannose.

Gli agenti di tipo chimico agiscono assorbendo la radiazione ultravioletta. Cinnamato, salicilati e acido para-aminobenzoico sono i più usati nella protezione contro gli UVB; i derivati della canfora agiscono su entrambi i tipi di raggio. L'assorbimento dell'energia dei fotoni cambia la distribuzione degli elettroni delle molecole contenute nelle creme, portandoli ad uno stato di eccitazione; tornando allo stato iniziale l'energia viene dissipata attraverso l'emissione di fluorescenza e calore. Negli ultimi anni sono stati introdotti filtri di nuova generazione che proteggono da entrambi i tipi di raggi e sono più stabili.

L'efficacia di queste creme è ancora argomento di discussione: sembra infatti che alcune sostanze non proteggano adeguatamente dagli ultravioletti (soprattutto se applicate in modo scorretto). In alcuni casi (anche se rari) queste protezioni solari causano addirittura reazioni irritanti e allergiche (Lautenschlage S et al, 2007; Svobodová A et al, 2010).

Per questo motivo sono stati studiati nuovi metodi per proteggere la cute:

- aumentare la pigmentazione della pelle attraverso l'applicazione di melanina o dei suoi precursori (L-tirosina e L-DOPA) (Brown DA, 2001);
- indurre la produzione di melanina nello strato corneo tramite il diidrossiacetone (DHA) (Brown DA, 2001);
- applicazione cutanea degli enzimi antiossidanti catalasi e superossido dismutasi tramite trasfezione con vettore lentivirale (Rezvani HR et al, 2007);
- trattamento topico con una lozione contenente enzimi di riparazione del DNA (utilizzato soprattutto in pazienti con difetti al meccanismo NER) (Yarosh DB et al, 1999);
- uso topico e sistemico di composti contenenti antiossidanti non enzimatici come le vitamine e i carotenoidi (Böhm F et al, 1998), la cui efficacia però è ancora molto in discussione (McArdle F et al, 2004);
- utilizzo di metaboliti secondari delle piante, soprattutto i composti fenolici.

Lo studio, condotto su due linee cellulari (NCTC-2544 e HaCaT) e su un modello *ex vivo* di cute umana, ha permesso di valutare innanzitutto la differente azione dei raggi ultravioletti sia in cheratinociti umani a diversi stadi di differenziazione che in un modello molto più complesso e sicuramente più vicino ad una reale situazione fisiologica quale quello della cute umana. Inoltre, è stata valutata la capacità di tre sostanze di origine naturale (estratto di *Vaccinium Myrtillus*, timolo ed estratto di *Thymus Vulgaris L.*), tutte appartenenti alla categoria dei polifenoli, di diminuire i danni indotti da questo tipo di irradiazione. Mentre l'efficacia dell'estratto di *Vaccinium Myrtillus* è stata studiata esclusivamente sui modelli *in vitro*, la capacità protettiva delle altre due sostanze è stata testata in entrambi i modelli (*in vitro* ed *ex vivo*). L'utilizzo, nel mio studio, di due modelli sperimentali (*in vitro* ed *ex vivo*) di differente complessità ha permesso una valutazione più



completa del danno genotossico indotto da UVA e UVB. Le linee cellulari NCTC 2544 e HaCaT sono considerate un buon modello per gli studi di tossicologia e fotogenotossicità che interessano la cute umana (Burlando B et al, 2008; Horinouchi M and Arimoto-Kobayashi S, 2011).

Molte delle evidenze presenti in letteratura riguardo il danno causato da UVA e UVB sono state confermate nei modelli sperimentali utilizzati in questo studio. Dai risultati ottenuti negli esperimenti di stress ossidativo *in vitro* appare evidente che gli UVA risultano essere in grado di causare un danno ossidativo maggiore rispetto ai raggi ultravioletti di tipo B portando ad un aumento delle specie reattive dell'ossigeno intracellulari e di lipoperossidazione. Inoltre, è evidente che il danno ossidativo sia maggiore nella linea cellulare NCTC 2544 rispetto alla linea HaCaT, che non evidenziano lipoperossidazione nel range di dosi da me testato. La maggiore sensibilità delle cellule NCTC-2544 (che hanno minore grado di differenziazione) allo stress ossidativo è legata, molto probabilmente, al basso livello di cheratinizzazione della membrana plasmatica e dalla minore attività delle difese antiossidanti endogene di questo tipo cellulare (Serini S et al, 2011).

Una considerazione più ampia va fatta per il potenziale genotossico dei due raggi. Dai risultati ottenuti nei modelli in studio le dosi di UVA utilizzate producono un danno genotossico lieve che si evidenzia solo alla dose maggiore utilizzata e che risulta significativo solo sul modello *in vitro* NCTC 2544. Questo potrebbe risultare in disaccordo con alcuni studi precedenti che hanno dimostrato la presenza di un forte danno genotossico dovuto all'esposizione ad UVA (Hseu Y-C et al, 2012). Bisogna tuttavia considerare che, come detto precedentemente, è importante tenere conto del sistema sperimentale su cui si effettua la valutazione. Il fatto che sulle due linee cellulari il danno genotossico non si manifesti in maniera evidente alle dosi testate di UVA potrebbe essere dovuto all'efficienza dei meccanismi di riparo del DNA. Questo può essere dedotto dai risultati ottenuti nel test dell'istone  $\gamma$ H2AX e nell'esperimento di analisi del ciclo cellulare. Il test dell'istone  $\gamma$ H2AX, eseguito un'ora dopo la fine del trattamento con UVA alla dose di 24 J/cm<sup>2</sup>, mostra la presenza di DSBs in tutte e due le linee cellulari; contemporaneamente l'analisi del ciclo cellulare nelle due linee (eseguito 24 ore dopo la fine delle irradiazioni) evidenzia la presenza di un blocco in fase S. La dose inferiore di UVA utilizzata nel test induce un aumento di cellule in fase G<sub>2</sub>/M, contrariamente alla dose maggiore che mostra un aumento di fase Sub-G<sub>1</sub>. Questo opposto effetto delle due dosi di raggi UVA, in tutte e due le linee cellulari, potrebbe essere spiegato facendo riferimento al checkpoint cellulare presente in fase G<sub>2</sub>, il checkpoint che controlla le dimensioni

cellulari, la completa duplicazione, l'integrità del materiale genetico e durante il quale si ha la riparazione degli eventuali danni rilevati al DNA. Dai risultati ottenuti nel test, si può ipotizzare che le cellule irradiate con UVA si fermino in fase S per analizzare il danno subito: se il danno è riparabile allora successivamente entrano in fase G<sub>2</sub>/M e la cellula si accresce nuovamente (come succede nella dose 16 J/cm<sup>2</sup>), se il danno subito è molto elevato allora non si ha alcun riparo, anzi si ha l'innesco dei processi apoptotici (aumento della fase Sub-G<sub>1</sub>, come succede per la dose 24 J/cm<sup>2</sup>). Ricordando inoltre che il danno genotossico esercitato dagli UVA passa attraverso la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) è probabile che i modelli cellulari utilizzati in questa sperimentazione siano dotati di sistemi enzimatici particolarmente efficienti che neutralizzano parte dei ROS prodotti, causa di danno al DNA. L'analisi del danno genotossico (test dell'istone H2AX) indotto da UVA in sezioni di cute incluse in paraffina evidenzia la presenza di un esiguo numero di cellule positive alla colorazione (DBSs) limitate solo allo strato basale dell'epidermide, ed assente negli strati più superficiali. E' ben noto che le lesioni foto ossidative (8-oxo-dG) provocate dagli UVA siano riparate dall'enzima di riparo del DNA 8-ossiguanina-DNA glicosidasi 1 (OGG1). I livelli proteici e di mRNA di OGG1 sono bassi negli strati inferiori dell'epidermide umana, rispetto agli strati superiori. Questa differenza sembra essere correlata con il differente stato differenziativo dei cheratinociti, dato che l'induzione della differenziazione determina l'aumento dei livelli di espressione di OGG1. In accordo con questa considerazione, il riparo delle lesioni indotte da UVA (8-oxo-dG) è minore nello strato basale dell'epidermide umana comparato con quello degli strati superiori (*Halliday GM et al, 2011*). Gli UVB hanno mostrato un potenziale genotossico maggiore rispetto agli UVA in tutti i test di genotossicità effettuati e su entrambe i modelli sperimentali (*in vitro* ed *ex vivo*).

A proposito di questa affermazione è da sottolineare che per evidenziare l'effetto genotossico dei raggi ultravioletti B sulle biopsie cutanee è stato necessario utilizzare dosi più elevate rispetto a quelle utilizzate per le valutazioni *in vitro*. Questo risultato non è da interpretare come un'assenza di danno reale da parte dei raggi UVB ma come una conferma dell'importante funzione barriera che la cute svolge sull'organismo. Bisogna ricordare infatti che le dosi utilizzate sono state scelte in un range di esposizione reale. Parallelamente all'interesse suscitato dalla caratterizzazione dei danni da UVA e UVB molti gruppi hanno iniziato a studiare una serie di molecole al fine di prevenire questi danni, prestando particolare attenzione ai composti di origine naturale.

E' noto che il processo di cancerogenesi cutanea indotto dall'esposizione a raggi ultravioletti necessita di tempi lunghi per potersi sviluppare. Data la difficoltà di agire sulla fase di inizio, quindi sulla prevenzione dell'insorgenza di mutazioni (che sono presenti ad un livello basale fisiologico), molti studi volti a prevenire l'insorgenza di tumori cutanei si concentrano sulle fasi successive ad essa, ovvero sulle fasi di promozione e progressione tumorale. I target principali su cui agire per limitare la progressione di queste fasi sono lo stress ossidativo, il processo infiammatorio e l'instabilità genomica. Molte sono le conoscenze relative alle proprietà antiossidanti, antiinfiammatorie e anticancerogene dei composti di origine naturale (Afaq F, 2011); queste, unite alla capacità delle sostanze di origine naturale di svolgere lo stesso effetto delle molecole sintetiche risultando però meno tossiche in seguito a trattamento cronico, ne motivano il grande interesse suscitato in molti autori e nel mio studio (P.R A et al, 2011). Le applicazioni di questi studi sulle molecole di origine naturale sono molte e si inseriscono come proposto da Afaq F, 2011 e ancora prima da Nichols JA and Katiyar SK, 2010 in un utilizzo che coinvolge l'intero stile di vita di un individuo. In questi studi gli autori considerano la difficoltà nel limitare l'esposizione alle radiazioni ultraviolette e propongono piuttosto un'associazione tra l'introduzione di buone abitudini alimentari e l'utilizzo appropriato di prodotti per la cura della pelle. Tra i composti di origine naturale i più studiati, fino ad ora, sono quelli che appartengono alla famiglia dei polifenoli. I polifenoli comprendono diverse sottofamiglie di molecole tra cui i flavonoidi, molecole molto complesse che derivano dal metabolismo secondario delle piante. Questi composti sono da tempo studiati principalmente per le loro capacità antiossidanti confermate da numerosi studi (Di Meo F et al, 2013) che ne hanno dimostrato l'azione di neutralizzatori di radicali liberi (free-radical scavengers). Si è scelto, per questo motivo, di utilizzare un estratto di *Vaccinium Myrtillus*, una specie di mirtillo contenente un'altissima concentrazione di antocianine (297,4 mg/100 g di prodotto fresco) perchè, in un lavoro condotto precedentemente in laboratorio, è risultato essere efficace nella protezione da danno ossidativo indotto da ter-butyl idroperossido in cellule di adenocarcinoma polmonare umano (A549). Di grande interesse sono risultati anche gli olii essenziali di numerose piante aromatiche per cui sono state dimostrate le stesse proprietà antiossidanti agendo anch'essi come free-radical scavengers. In particolare Anthony KP et al, 2012 hanno condotto uno studio in cui è stata testata la capacità antiossidante di una serie di olii essenziali provenienti da 48 diverse famiglie botaniche. I risultati di questo studio hanno mostrato che tra le otto famiglie con la maggiore capacità antiossidante era presente la famiglia delle Lamiaceae a cui appartiene la specie *Thymus Vulgaris L.*

utilizzata nel mio studio; in aggiunta a ciò è stata fatta una valutazione quantitativa della composizione di questi olii essenziali la quale ha indicato i composti fenolici (tra cui il timolo) come maggiori costituenti degli olii essenziali analizzati. Le valutazioni di stress ossidativo *in vitro* condotte sulle linee cellulari NCTC 2544 e HaCaT hanno confermato gli studi sulle capacità antiossidanti dell'estratto di *Vaccinium Myrtillus*, del timolo e dell'estratto di *Thymus Vulgaris L.*. Nella scelta delle concentrazioni di *Vaccinium Myrtillus* e timolo da utilizzare sono state inoltre prese in considerazione ipotesi sull'azione pro-ossidante di alcune note molecole antiossidanti dovuta presumibilmente ai loro metaboliti (Halliwell B et al, 2005); ipotesi che sono state confermate dai test preliminari sui modelli considerati in questo studio sull'attività dell'estratto di mirtillo e del timolo nei confronti dello stato ossidativo cellulare basale. Tutte e tre le sostanze prese in esame hanno dimostrato buone capacità antiossidanti. In particolare, il pretrattamento delle cellule con *Vaccinium Myrtillus* è risultato in grado di ridurre quasi completamente la quantità di specie reattive dell'ossigeno generate in seguito ad irradiazione delle due linee cellulari con UVA, specialmente nella linea cellulare NCTC 2544. E' stato precedentemente dimostrato che l'estratto di *Vaccinium Myrtillus* è efficace nel ridurre i marker di stress ossidativo perchè aumenta l'attività degli enzimi antiossidanti e agisce da scavenger (Laplaud PM et al, 1997). Al contrario, non dimostra la sua capacità protettiva nei confronti dei ROS generati nelle due linee dopo esposizione ai raggi UVB, probabilmente perché il processo di formazione ROS in questo caso deriva da una cascata di eventi molto più complessa rispetto a quella che genera ROS dopo irradiazione con UVA. Anche il pretrattamento delle cellule con il timolo è risultato in grado di ridurre quasi completamente la quantità di specie reattive dell'ossigeno generate in seguito ad irradiazione con UVA e UVB. L'attività protettiva dell'estratto di *Thymus Vulgaris L.*, seppur inferiore comparata a quella del timolo, è più significativa nella linea cellulare HacaT, caratterizzata probabilmente da un corredo di enzimi antiossidanti più efficienti. La maggior capacità protettiva del timolo rispetto a quella dell'estratto di *Thymus Vulgaris L.* potrebbe far pensare all'assenza di un effetto sinergico tra tutti i componenti dell'estratto di timo, tra cui il timolo è il principale componente.

Nella valutazione della perossidazione lipidica rilevata nelle cellule NCTC 2544 in seguito ad irradiazione con UVA sia il *Vaccinium Myrtillus*, che il timolo che l'estratto di *Thymus Vulgaris L.* hanno evidenziato la loro capacità protettiva nei confronti di questo danno. Sicuramente, però, il timolo e l'estratto di timo hanno evidenziato una più marcata capacità protettiva rispetto al

*Vaccinium Myrtillus*, ed inoltre, timolo ed estratto mostrato le stesse, e significative, capacità protettive nei confronti della produzione di ROS. Ricordando che la perossidazione lipidica è un processo complesso dovuto all'azione di diverse specie reattive (sia dell'ossigeno che dell'azoto) e che porta alla formazione di numerosi prodotti, questi risultati portano ad ipotizzare che l'estratto di *Thymus Vulgaris L.*, in quanto miscela complessa, possa svolgere la sua capacità protettiva non agendo direttamente solo sulle specie reattive dell'ossigeno ma anche su altre componenti del processo di stress ossidativo. L'assenza di perossidazione lipidica in cellule HaCaT irradiate con UVA potrebbe, invece, esser dovuta alla membrana maggiormente cheratinizzata (dovuto alla maggiore differenziazione) (Nogueira DR et al, 2011) di questo tipo cellulare e ai suoi più efficienti sistemi antiossidanti endogeni.

Il danno genotossico causato dai raggi UVA è dato dall'ossidazione delle basi del DNA: per questo motivo è di entità lieve ed è riparato grazie all'attività dei sistemi endogeni scavenger in grado di inattivare quella quota di ROS responsabili del danneggiamento della doppia elica del DNA.

Nel caso degli UVB, la genotossicità è causata prevalentemente dall'azione diretta dei raggi sulla doppia elica; per questo motivo il danno è maggiore rispetto a quello dato dagli UVA. *Vaccinium Myrtillus*, timolo ed estratto di *Thymus Vulgaris L.* diminuiscono il danno genotossico, in entrambi i modelli (*in vitro* ed *ex vivo*), anche se meno efficacemente rispetto a quello ossidativo, grazie probabilmente alla capacità dei composti polifenolici in essi contenuti di indurre l'espressione di geni del pathway di riparazione NER, come ad esempio XPC (Katiyar SK et al, 2011). Per le considerazioni sulla protezione nei confronti del danno genotossico da parte di timolo ed estratto di timo, i dati che presento in tesi potrebbero risultare in disaccordo con i pochi studi presenti in letteratura. Buyukleyla M and Rencuzogullari E, 2009, ad esempio, hanno condotto uno studio *in vitro* su linfociti umani in cui viene mostrato un effetto genotossico del timolo che porta alla formazione di micronuclei e di aberrazioni cromosomiche. Altri studi hanno mostrato potenziale genotossico associato al timolo e ad altri composti presenti negli olii essenziali di piante aromatiche (Stammati A et al, 1999). Questi studi tuttavia utilizzano concentrazioni di questi composti ben superiori (nell'ordine delle mM) rispetto a quella valutata nel mio studio (6.6 µM) che non ha mostrato effetto genotossico in nessuno dei test effettuati. Uno studio che, contrariamente ai precedenti citati, supporta la scelta del timolo per le mie valutazioni sul potenziale antigenotossico è quello di Ündeğer U et al, 2009. Questi autori si propongono di valutare il potenziale genotossico e

antiossidante dei principali costituenti dell'olio essenziale di timo in un modello *in vitro* costituito da fibroblasti polmonari di criceto. Le concentrazioni di timolo utilizzate in questo studio (1-5 $\mu$ M) risultano molto simili a quella utilizzata nelle mie valutazioni e i risultati ottenuti mostrano come basse concentrazioni di timolo non inducano alcun danno genotossico basale. Poiché al momento della valutazione del danno genotossico indotto da UVA e UVB il danno maggiore sui modelli sperimentali utilizzati è stato rilevato in seguito ad esposizione ad UVB le considerazioni sulla capacità protettiva dell'estratto di mirtillo, di timolo e dell'estratto di timo riguardano principalmente questo aspetto. I dati ottenuti negli esperimenti di comet alcalino nel modello *in vitro* indicano una capacità protettiva da parte di tutte le sostanze utilizzate. La capacità da parte di timolo ed estratto di timo di ridurre il danno al DNA risulta visibile sia nel modello *in vitro* che in quello *ex vivo*. La protezione inoltre risulta significativa, per il parametro analizzato, anche nei confronti delle dosi più alte di UVB utilizzate in questo test. Al contrario negli esperimenti di valutazione della produzione di micronuclei *in vitro* (NCTC 2544) la protezione da parte delle sostanze in esame, seppur presente, risulta lieve e non significativa anche alle dosi più basse di UVB utilizzate nel test. Se non si tenesse conto del tipo di danno valutato nei due test si potrebbe pensare ad un disaccordo nei dati ottenuti. Bisogna invece sottolineare che il comet test e il test del micronucleo permettono una valutazione del danno genotossico di origine e di entità diverse. Un danno al singolo o doppio filamento (valutato dal comet test) risulta infatti meno ingente di un danno cromosomico o del fuso mitotico (valutato dal test del micronucleo). Risulta dunque ipotizzabile che sia il *Vaccinium Myrtillus*, che il timolo e l'estratto di timo sono in grado di svolgere un'azione protettiva nei confronti del danno genotossico indotto dai raggi UVB ma questa protezione non è completa e non è più visibile se il tipo di danno genotossico presente è troppo ingente. Inoltre l'analisi del ciclo cellulare delle NCTC 2544 in seguito ad irradiazione con UVB mostra che alla dose di UVB più alta utilizzata non si ha più il blocco del ciclo cellulare ma aumentano le cellule in fase sub-G<sub>1</sub> che possono essere considerate cellule in apoptosi. Questo porta ad un'altra considerazione per cui anche se le sostanze esaminate non portano ad un recupero del danno da micronucleo possono comunque essere considerate protettive in quanto non impediscono il processo apoptotico che è un meccanismo di difesa utilizzato dalla cellula nel momento in cui è presente un danno troppo esteso, come confermato dai risultati ottenuti nel test dell'Annexina V condotto sulla linea cellulare NCTC 2544. Gli esperimenti di valutazione di produzione di micronuclei nella linea cellulare HaCaT e nel modello *ex vivo*, invece, evidenziano l'incapacità

cellulare di aumentare la formazione di micronuclei a seguito di irradiazione con UVB. Riguardo il modello *in vitro* HaCaT, anche in questo caso, i risultati ottenuti non sono in disaccordo con quelli ottenuti nel comet test. Infatti, l'analisi dell'apoptosi, effettuata mediante il test dell'Annexina V dimostra che la cellula favorisce l'innescamento dei processi apoptotici a discapito della formazione di micronuclei che potrebbero permettere, invece, la sopravvivenza di cellule gravemente danneggiate e mutate e di conseguenza l'avvio di processi di cancerogenesi. *Vaccinium Myrtillus*, timolo ed estratto dimostrano un comportamento differente nei confronti dell'apoptosi in cellule HaCaT. In particolare, mentre l'effetto protettivo di *Vaccinium Myrtillus* si esplica attraverso una non riduzione dell'evento apoptotico, quello di timolo ed estratto di timo avviene con meccanismo opposto mediante lieve riduzione del quantitativo di cellule apoptotiche. L'analisi del ciclo cellulare della linea HaCaT conferma l'incremento dose dipendente della percentuale di cellule in fase Sub-G<sub>1</sub>, risultato che comprova l'incremento di apoptosi riscontrato nel test dell'Annexina V. Le valutazioni del danno genotossico, apoptotico e del ciclo cellulare effettuati sul modello *ex vivo* esposto ad irradiazioni con raggi UVB confermano i risultati ottenuti nella linea cellulare HaCaT. Particolare risulta essere l'effetto del pretrattamento dei campioni biotici con estratto di *Thymus Vulgaris L.* sugli eventi apoptotici: il suo potere protettivo si esplica, infatti, attraverso l'incremento del quantitativo di cellule apoptotiche, impedendo in questo modo l'accumulo di cellule con DNA estremamente compromesso.

L'effetto dei tre composti di origine naturale sulla cascata apoptotica è stato studiato per cercar di capire se l'innescamento dei processi di morte cellulare programmata fosse dovuto alla via estrinseca attivata dai recettori della morte, oppure se fosse intrinseca cioè causata da una alterazione del mitocondrio a causa di una sovrapproduzione di ROS. Per valutare questi aspetti è stata dapprima studiata la variazione del potenziale di membrana mitocondriale (fase precoce del processo apoptotico) seguita da un'analisi dell'evento apoptotico nelle sue fasi finali (traslocazione della fosfatidilserina sul lato extracellulare della membrana plasmatica, test dell'Annexina V). L'analisi della caduta di potenziale mitocondriale sui modelli *in vitro* è negativa per entrambi le linee cellulari. Questo dato permette di presupporre che sia i raggi UVA che UVB non inducono apoptosi mediante la via intrinseca ROS mediata. In particolare, i risultati ottenuti permettono di ipotizzare che i raggi UVA non causano alcun danno genotossico e apoptotico grazie agli efficienti meccanismi di riparo e scavenger intrinseci della cellula, i quali sono in grado di inattivare i ROS

prodotti dall'irradiazione e che potrebbero essere la causa di un successivo danno al DNA. Riguardo gli UVB si potrebbe supporre che o seguano quasi esclusivamente la via estrinseca che consiste nella diretta attivazione dei recettori della morte CD95/Fas (senza il legame di un ligando specifico) che interagiscono con molecole effettrici dell'apoptosi (le caspasi) (*Rezvani HR et al, 2006*), oppure che inducano apoptosi in maniera diretta a causa della presenza di un danno al DNA estremamente ingente.

In relazione ai dati ottenuti in questa sperimentazione, una valutazione conclusiva sul potenziale protettivo e antigenotossico del *Vaccinium Myrtillus*, del timolo e della miscela complessa estratta da foglie di *Thymus Vulgaris L.* (che lo contiene come componente principale) permette di affermare che queste sostanze sono in grado di svolgere, con gradi differenti, un'azione protettiva nei confronti del danno indotto da raggi UVA e UVB sia in due linee cellulari di cheratinociti umani a differente stadio differenziativo, che nel modello più complesso di cute umana (solo timolo ed estratto di timo).

Vista la capacità protettiva di *Vaccinium Myrtillus*, timolo (come composto singolo) ed estratto di *Thymus Vulgaris L.* (come miscela complessa) si potrebbe pensare di prenderli in considerazione come ingredienti aggiuntivi in creme solari o integratori orali dopo aver chiarito i meccanismi alla base della loro stabilità e attività. Trial clinici potrebbero quindi risultare utili a validare innanzitutto la biodisponibilità di queste sostanze e altri agenti antiossidanti di natura vegetale nonché il potenziale terapeutico e preventivo nei confronti di danni indotti da luce ultravioletta.



## **BIBLIOGRAFIA**

Afaq F et al (2001). Effects of solar radiation on cutaneous detoxification pathways. *J Photochem Photobiol B*, 63(1-3):61-69.

Afaq F (2011). Natural agents: Cellular and molecular mechanisms of photoprotection. *Arch. Biochem. Biophys.*, 508, 144–151.

Aitken GP et al (2007). Direct monitoring of UV-induced free radical generation in HaCaT keratinocytes. *Clin Exp Dermatol*, 32(6):722-727.

Ambrosi et al (2004). Anatomia dell'uomo. Edi-Ermes. Parte seconda. Capitolo 17. Pag 429-436.

Amiri H (2012). Essential Oils Composition and Antioxidant Properties of Three Thymus Species. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 1–8.

Anthony KP et al (2012). Comprehensive Assessment of Antioxidant Activity of Essential Oils. *J. Food Sci.*, 77, C839–C843.

Appeldorn MM et al (2009). Some phenolic compounds increase the nitric oxide level in endothelial cells in vitro. *J Agric Food Chem*, 7693-7699.

Archana PR et al (2009). Thymol, a naturally occurring monocyclic dietary phenolic compound protects Chinese hamster lung fibroblasts from radiation-induced cytotoxicity. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.*, 680, 70–77.

Avlasevich SL et al (2006). In vitro micronucleus scoring by flow cytometry: differential staining of micronuclei versus apoptotic and necrotic chromatin enhances assay reliability. *Environ. Mol. Mutagen.*, 47, 56–66.

Ayala F et al (2013). The Role of Optical Radiations in Skin Cancer. *ISRN Dermatol.*, 1–8.

Azirak S and Rencuzogullari E (2008). The in vivo genotoxic effects of carvacrol and thymol in rat bone marrow cells. *Environ. Toxicol.*, 23, 728–735.

- Azzi et al (2002). The role of a-tocopherol in preventing disease: from epidemiology to molecular events. *Mol Aspects Med*, 24(6) :3 25-36.
- Baba S et al (2007). Continuous intake of polyphenolic compounds containing cocoa powder reduces LDL oxidative susceptibility and has beneficial effects on plasma HDL-cholesterol concentrations in humans. *Am J Clin Nutr*, 85(3):709-17.
- Bartberger MD et al (2002). The reduction potential of nitric oxide (NO) and its importance to NO biochemistry. *Procl Nat Acad Sci U.S.A.*, 20;99(17):10958-10963.
- Baumann L (2007). Skin ageing and its treatment. *J Pathol*, 211: 241–251.
- Bazzoni G e al (2007). L'endotelio: fisiopatologia, basi molecolari e implicazioni terapeutiche. Ed. Piccin.
- Bernerd F et al (1998). UVA exposure of human skin reconstructed in vitro induces apoptosis of dermal fibroblasts: subsequent connective tissue repair and implications in photoaging. *Cell Death Differ*, 5(9) : 792-802.
- Bertuglia S et al (1995). Effect of Vaccinium myrtillus anthocyanosides on ischaemia reperfusion injury in hamster cheek pouch microcirculation. *Pharmacol Res*, 31 : 183-187.
- Bhat KP et al (2002). Cancer chemopreventive activity of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci*, 957:210-29.
- Bonner WM et al (2008). GammaH2AX and cancer. *Nat Rev Cancer*. 8 (12) : 957-967.
- Böhm F et al (1998). Enhanced protection of human cells against ultraviolet light by antioxidant combinations involving dietary carotenoids. *J Photochem Photobiol B*, 44(3) : 211-215.
- Boyle SP et al (2000). Bioavailability and efficiency of rutin as an antioxidant: a human supplementation study. *Eur J Clin Nutr*, 54(10) : 774-82.
- Braga PC (2006). Oli essenziali del genere Thymus e il timolo: azioni farmacologiche. Ed. Johan & Levi editore.

- Bravetti G et al (1989). Preventive medical treatment of senile cataract with vitamin E and Vaccinium myrtillus anthocyanosides: clinical evaluation. *Annali di Ottalmologia e Clinica Oculistica*, 115, 109–116.
- Brown DA (2001). Skin pigmentation enhancers. *J Photochem Photobiol B*, 63 (1-3) : 148-161.
- Bryce SM et al (2007). In vitro micronucleus assay scored by flow cytometry provides a comprehensive evaluation of cytogenetic damage and cytotoxicity. *Mutat Res*, 15; 630 (1-2) : 78-91.
- Burkitt MJ et al (1996). 1,10-Phenanthroline stimulates internucleosomal DNA fragmentation in isolated rat-liver nuclei by promoting the redox activity of endogenous copper ions. *Biochem J*, 313, 163-170.
- Burlando B et al (2008). Comparison of the irritation potentials of Boswellia serrata gum resin and of acetyl-11-keto- $\beta$ -boswellic acid by in vitro cytotoxicity tests on human skin-derived cell lines. *Toxicol Lett*, 177 (2) : 144-9.
- Buyukleyla M and Rencuzogullari E (2009). The effects of thymol on sister chromatid exchange, chromosome aberration and micronucleus in human lymphocytes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 943–947.
- Cadenas E et al (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Bio Med*, 29 (3-4) : 222-230.
- Cadet J et al (2011). Oxidatively generated damage to DNA by UVA radiation in cells and human skin. *J Invest Dermatol*, 131 (5) : 1005-1007.
- Cadet J and Douki T (2011). Oxidatively Generated Damage to DNA by UVA Radiation in Cells and Human Skin. *J. Invest. Dermatol.* 131, 1005–1007.
- Camire ME (2000). Bilberries and blueberries as functional foods and nutraceuticals; *Herbs botanicals and teas*. Lancaster, PA: technomic publishing company. pp. 289–319.
- Cao G et al (1996.) Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure activity relationship. *Free Radic Biol Med*, 22 (5) : 749-760.

Caputo F et al (2012). Redox modulation of the DNA damage response. *Biochem. Pharmacol.* 84, 1292–1306.

Celotti F e Veraldi S. Patologia generale e fisiopatologia. Capitolo 18. Edises.

Cerutti PA et al (1991). Inflammation and oxidative damage in carcinogenesis. *Cancer Cells*, 3 (1) : 1-7.

Choi W et al (2010). Regulation of human skin pigmentation in situ by repetitive UV exposure: molecular characterization of responses to UVA and/or UVB. *J Invest Dermatol*, 130 (6) : 1685-1696.

Colombo R et al (2007). *Biologia dei tessuti*. Edi-ermes, Milano.

Corsini E et al (2013). NCTC 2544 and IL-18 production: A tool for the identification of contact allergens. *Toxicol. In Vitro*, 27, 1127–1134.

D’Errico M et al (2006). Cell type and DNA damage specific response of human skin cells to environmental agents. *Mutat Res*, 614 (1-2) : 37-47.

Davies KJ (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects. *J Biol Chem*, 262 (20) : 9895-901.

Di Meo F et al (2013). Free Radical Scavenging by Natural Polyphenols: Atom versus Electron Transfer. *J. Phys. Chem. A* 117, 2082–2092.

Didier C et al (1999). L-arginine increases UVAcytotoxicity in irradiated human keratinocyte cell line: potential role of nitric oxide. *Faseb J*, 13 (13) : 1817-24.

Dizdaroglu M et al (2002). Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement<sup>1, 2</sup>. *Free Radic. Biol. Med.* 32, 1102–1115.

Donetti E et al (2014). An innovative tree-dimensional model of normal human skin to study the proinflammatory psoriatic effects of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-17. *Cytokine* 68 (1): 1-8.

- Dreiseitel A et al (2008). Inhibition of proteasome activity by anthocyanins and anthocyanidins. *Biochem Biophys Res Commun*, 372 : 57–61.
- Dugas AJ Jr et al (2000). Evaluation of the total peroxy radical-scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationships. *J Nat Prod*, 63 (3) : 327-331.
- Duthie SJ (2007). Berry phytochemicals, genomic stability and cancer: evidence for chemoprotection at several stages in the carcinogenic process. *Mol Nutr Food Res*, 51 (6) : 665-674.
- Duval C et al (2003). The use of reconstructed human skin to evaluate UV-induced modifications and sunscreen efficacy. *Exp Dermatol*, 64-70.
- El Ghissassi F et al (2009). A review of human carcinogens-part D: radiation. *Lancet Oncol*, 10 (8) : 751-752.
- El Mohsen MA (2006). Absorption, tissue distribution and excretion of pelargonidin and its metabolites following oral administration to rats. *Br J Nutr*, 95 (1) : 51-58.
- Erlund I et al (2008). Favourable effects of berry consumption on platelet function, blood pressure, and HDL cholesterol. *Am J Clin Nutr*, 87 : 323–331.
- Fassina G et al (2004). Mechanisms of inhibition of tumor angiogenesis and vascular tumor growth by epigallocatechin-3-gallate. *Clin Canc Res*, 10 : 4865-4873.
- Galleano M et al (2010). Antioxidant actions of flavonoids: thermodynamic and kinetic analysis. *Arch Biochem Biophys*, 501 (1) : 23-30.
- Galli CL et al. Tossicologia. Piccin. II edizione.
- Gambichler T et al (2002.) Impact of UVA exposure on psychological parameters and circulating serotonin and melatonin. *BMC Dermatol*, 12; 2:6.
- Greinert R (2012). UVA-induced DNA double-strand breaks result from the repair of clustered oxidative DNA damages. *Nucleic Acids Res*, 40 (20) : 10263-10273.
- Grosso C et al (2010). Composition and antioxidant activity of *Thymus vulgaris* volatiles: Comparison between supercritical fluid extraction and hydrodistillation. *J. Sep. Sci.* 33, 2211–2218.

- Halliday GM et al (2011). Ultraviolet A radiation: its role in immunosuppression and carcinogenesis. *Cutan Med Surg*, 30 (4) : 214-221.
- Halliwell B (2007a). Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Arch Biochem Biophys*, 476 (2) :107-112.
- Halliwell B (2007b). Dietary polyphenols: good, bad or indifferent for your health? *Cardiovasc Res*, 73 (2) : 341-347.
- Halliwell B et al (2005). Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 268S–276S.
- Hanif S et al (2008). The anthocyanidin delphinidin mobilizes endogenous copper ions from human lymphocytes leading to oxidative degradation of cellular DNA. *Toxicology*, 249 (1) : 19-25.
- Harman D (1981). The aging process. *Procl Nat Acad Sci U.S.A*, 78 (11) : 7124-7128.
- Harrison GI and Young AR (2002). Ultraviolet radiation-induced erythema in human skin. *Methods*, 28: 14-19.
- Hashemipour H et al (2013). Effect of thymol and carvacrol feed supplementation on performance, antioxidant enzyme activities, fatty acid composition, digestive enzyme activities, and immune response in broiler chickens. *Poult. Sci.* 92, 2059–2069.
- He YY et al (2005). Role of phagocyte oxidase in UVA-induced oxidative stress and apoptosis in keratinocytes. *J Invest Dermatol*, (125) 3 : 560-566.
- Hermes-Lima M et al (2004). Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*, 319-368.
- Holick MF (2004). Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*, 80(suppl):1678S– 88S.
- Horinouchi M and Arimoto-Kobayashi S (2011). Photomicronucleus assay of phototoxic and pseudophotoclastogenic chemicals in human keratinocyte NCTC2544 cells. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 723, 43–50.

- Hseu Y-C et al (2012). Ellagic acid protects human keratinocyte (HaCaT) cells against UVA-induced oxidative stress and apoptosis through the upregulation of the HO-1 and Nrf-2 antioxidant genes. *Food Chem. Toxicol.* 50, 1245–1255.
- Hussein MR (2005). Ultraviolet radiation and skin cancer: molecular mechanisms. *J Cutan Pathol*, 32; 191-205.
- Huttunen S et al (2011). Inhibition activity of wild berry juice fractions against *Streptococcus pneumoniae* binding to human bronchial cells. *Phytother Res*, 25 (1) : 122-127.
- Ikehata H and Ono T (2011). The Mechanisms of UV Mutagenesis. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* 52, 115–125.
- Jandova J et al (2012). Cyclophilin 40 alters UVA-induced apoptosis and mitochondrial ROS generation in keratinocytes. *Exp Cell Res*, 10;319 (5) : 750-760.
- Juzeniene A et al (2012). Beneficial effects of UV radiation other than via vitamin D production. *Dermatoendocrinol*, 4 (2) : 109-117.
- Kadaja M et al (2014). SOX9: a stem cell transcriptional regulator of secreted niche signaling factors. *Genes Dev.* 28, 328–341.
- Kahkonen MP et al (2003). Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *J Agric Food Chem*, 51 (3) : 628-633.
- Karlsen A et al (2007). Anthocyanins inhibit nuclear factor- $\kappa$ B activation in monocytes and reduce plasma concentrations of pro-inflammatory mediators in healthy adults. *J Nutr*, 137 : 1951–1954.
- Karlsen A et al (2010). Bilberry juice modulates plasma concentration of NF- $\kappa$ B related inflammatory markers in subjects at increased risk of CVD. *Eur J Nutr*, 2;49 : 345–355 .
- Katiyar SK et al (2010). Green tea polyphenols prevent UV-induced immunosuppression by rapid repair of DNA damage and enhancement of nucleotide excision repair genes. *Cancer Prev Res (Phila)*, 3 (2) : 179-189.

- Katiyar SK et al (2011). Silymarin protects epidermal keratinocytes from ultraviolet radiation-induced apoptosis and DNA damage by nucleotide excision repair mechanism. *PloS One*, 6(6):e21410.
- Khan N et al (2006). Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Res*, 66 (5) : 2500-2505.
- Kim KJ et al (2002). Modulation of base excision repair alters cellular sensitivity to UVA1 but not to UVB1. *Photochem Photobiol*, 75 (5) : 507-512.
- Kim YA et al (2004). Resveratrol inhibits cell proliferation and induces apoptosis of human breast carcinoma MCF-7 cells. *Oncol Rep*, 11 (2) : 441-446.
- Kim Y-S et al (2014). Thymol from *Thymus quinquecostatus* Celak. protects against tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress in Chang cells. *J. Nat. Med.* 68, 154–162.
- Kolehmainen M et al (2012). Bilberries reduce low-grade inflammation in individuals with features of metabolic syndrome. *Mol Nutr Food Res*, 56 (10) : 1501-1510.
- Kolosova NG et al (2006). Long term antioxidant supplementation attenuates oxidative stress markers and cognitive deficits in senescent-accelerated OXYS rats. *Neurobiol Aging*, 27 : 1289–1297.
- Kong JM et al (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64 (5) : 923-933.
- Koponen JM (2007). Contents of anthocyanins and ellagitannins in selected foods consumed in Finland. *J Agric Food Chem*, 55 (4) : 1612-1619.
- Kostyuk V et al (2008). Plant polyphenols against UV-C-induced cellular death. *Planta Med*, 74 (5) : 509-514.
- Kowluru RA et al (2001). Abnormalities of retinal metabolism in diabetes and experimental galactosemia. VII. Effect of long-term administration of antioxidants on the development of retinopathy. *Diabetes*, 50,1938–1942.



Kuchel JM et al (2003). Nitric oxide appears to be a mediator of solar-simulated ultraviolet radiation-induced immunosuppression in humans. *J Invest Dermatol*, 121 : 587-593.

Kulms D et al (2002). DNA damage, death receptor activation and reactive oxygen species contribute to ultraviolet radiation-induced apoptosis in an essential and independent way.

Lala G et al (2006). Anthocyanin-rich extracts inhibit multiple biomarkers of colon cancer in rats. *Nutr Cancer*, 54 : 84–93.

Lambert JD et al (2005). Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. *Am J Clin Nutr*, 284S-291S.

Lankinen M et al (2011). Whole grain products, fish and bilberries alter glucose and lipid metabolism in a randomized, controlled trial: the Sysdimet study. *PloS One*, 6 (8): e22646.

Laplaud PM et al (1997). Antioxidant action of *Vaccinium myrtillus* extract on human low density lipoproteins in vitro: initial observations. *Fundam Clin Pharmacol*, 11 (1) : 35-40.

Lautenschlage S et al (2007). Photoprotection. *Lancet*, 370 (9586) : 528-537.

Lehman TA et al (1993). p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines. *Carcinogenesis*, 14 (5) : 833-839.

Li G et al (1998). p53-dependent DNA repair and apoptosis respond differently to high- and low-dose ultraviolet radiation. *Br J Dermatol*, 139 (1) : 3-10.

Lowry OH et al (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265–275.

Manach C et al (2004). Polyphenols: food source and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 79 (5) : 727-747.

Marabini L et al (2011). Genotoxic effects of polychlorinated biphenyls (PCB 153, 138, 101, 118) in a fish cell line (RTG-2). *Toxicol. In Vitro* 25, 1045–1052.

- Mardaryev AN et al (2014). p63 and Brg1 control developmentally regulated higher-order chromatin remodelling at the epidermal differentiation complex locus in epidermal progenitor cells. *Development* 141, 101–111.
- Marin FR et al (2005). Isoflavones as functional food components. *Stud Nat Prod Chem*, 32:1177-1207.
- Mariottini GL et al (2010). Introduzione alle colture cellulari. Ed Tecniche Nuove, Milano.
- Marnet LJ (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 21 (3) : 361-370.
- McArdle F et al (2004) Effects of oral vitamin E and beta-carotene supplementation on ultraviolet radiation-induced oxidative stress in human skin. *Am J Clin Nutr*, 80 (5) : 1270-1275.
- McDougall GJ et al (2008). Current developments on the inhibitory effects of berry polyphenols on digestive enzymes. *Biofactors*, 34:73–80.
- McGhie TK et al (2007). The bioavailability and absorption of anthocyanins: towards a better understanding. *Mol Nutr Food Res*, 51 (6) : 702-713.
- Meeran N et al (2012). Protective effects of thymol on altered plasma lipid peroxidation and nonenzymic antioxidants in isoproterenol-induced myocardial infarcted rats. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 26, 368–373.
- Michael F Holick PJ et al (2004). Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Appl. Nutr.* 155.
- Moehrle M (2008). Outdoor sports and skin cancer. *Clin dermatol*, 26 (1) : 12-15.
- Moeller R et al (2010). Genomic bipyrimidine nucleotide frequency and microbial reactions to germicidal UV radiation. *Arch Microbiol*, 192 : 521–529.
- Mouret S et al (2010). UVA-induced cyclobutane pyrimidine dimers in DNA: a direct photochemical mechanism? *Org Biomol Chem*, 8 (7) : 1706-1711.
- Naidu KA (2003). Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *Nutr J*, 21;2:7.

Narayanapillai S et al (2012). Silibinin is a potent sensitizer of UVA radiation-induced oxidative stress and apoptosis in human keratinocyte HaCaT cells. *Photochem Photobiol*, 88 (5) : 1135-1140.

Netzlaff F et al (2005). The human epidermis models EpiSkin, SkinEthic and EpiDerm: an evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport. *Eur J Pharm Biopharm*. 60 (2) : 167-178. Review.

Nichols JA and Katiyar SK (2010). Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Arch. Dermatol. Res*. 302, 71–83.

Nicoletti I (1991). A rapid simple method for measuring the mocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Immunol Methods* 139 (2), 271-279.

Nityanand M et al (2012) Shining light on skin pigmentation: the darker and the brighter side of effects of UV radiation. *Photochem Photobiol*, 88 : 1075-1082.

Nogueira DR et al (2011). Comparative sensitivity of tumor and non-tumor cell lines as a reliable approach for in vitro cytotoxicity screening of lysine-based surfactants with potential pharmaceutical applications. *Int J Pharm*, 25;420 (1) : 51-58.

Ocaña A and Reglero G (2012). Effects of Thyme Extract Oils (from *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis*, and *Thymus hyemalis*) on Cytokine Production and Gene Expression of oxLDL-Stimulated THP-1-Macrophages. *J. Obes*. 2012, 1–11.

P.R. A et al (2011). In vivo radioprotective potential of thymol, a monoterpene phenol derivative of cymene. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen*. 726, 136–145.

Phillipson RP et al (2002). UV-A induces persistent genomic instability in human keratinocytes through an oxidative stress mechanism. *Free Radic. Biol. Med*. 32, 474–480.

Pines A et al (2009). Differential activity of UV-DDB in mouse keratinocytes and fibroblasts: impact on DNA repair and UV-induced skin cancer. *(DNA) Repair (Amst)*, 8 (2) : 153-161.

Price P and McMillan TJ (1990). Use of the tetrazolium assay in measuring the response of human tumor cells to ionizing radiation. *Cancer Res*. 50, 1392–1396.

Punnonen K et al (1991). Effect of in vitro UVA radiation and PUVA treatment on membrane fatty acids and activities of antioxidant enzymes in human keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 2:255-259.

Puupponen-Pimiä R et al (2005). Bioactive berry compounds-novel tools against human pathogens. *Appl Microbiol Biotechnol*, 67:8–19.

Rechner AR et al (2002). The metabolism of dietary polyphenols and the relevance to circulating levels of conjugated metabolites. *Free Radic Res*, 36 (11) : 1229-1241.

Requena JR et al (1996.) Lipoxidation products as biomarkers of oxidative damage to proteins during lipid peroxidation reactions. *Nephrol Dial Transplant*, 11 Suppl 5:48-53.

Reus AA et al (2012). The use of ex vivo human skin tissue for genotoxicity testing. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 261, 154–163.

Rezvani HR et al (2006). Protective effects of catalase overexpression on UVB-induced apoptosis in normal human keratinocytes. *J Biol Chem*, 281 (26) : 17999-8007.

Rezvani HR et al (2007). Protection of normal human reconstructed epidermis from UV by catalase overexpression. *Cancer Gene Ther*, 14 (2) : 174-86.

Rice-Evans C (2004). Flavonoids and isoflavones: absorption, metabolism, and bioactivity. *Free Radic Biol Med*, 36 (7) : 827-8.

Riella HR et al (2012). Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. *Journal of Ethnopharmacology* 143: 656–663.

Rogakou EP et al (1998). DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139. *J Biol Chem* 273 (10): 5859-5869.

Ross JA et al (2002). Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects and safety. *Annu Rev Nutr*, 22:19-34.

Runger TM et al (2007). Mechanisms of mutation formation with long-wave ultraviolet light (UVA). *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 24 (1) : 2-10.

- Sachdeva S (2009). Fitzpatrick skin typing: Applications in dermatology. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, 75: 93-96.
- Saija A et al (1994). Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. *Free Radic Biol Med*, 19 (4) : 481-486.
- Saliou C et al (1999). Antioxidants modulate acute solar ultraviolet radiation-induced NF-KAPPA-B activation in a human keratinocyte cell line. *Free Radic Biol Med*, 26 (1-2) : 174-183.
- Samara de Lira Mota K et al (2012). Antifungal Activity of Thymus vulgaris L. Essential Oil and Its Constituent Phytochemicals against Rhizopus oryzae: Interaction with Ergosterol. *Molecules*, 17, 14418-14433.
- Satooka H and Kubo I (2012). Effects of Thymol on B16-F10 Melanoma Cells. *J. Agric. Food Chem.* 60, 2746–2752.
- Seeram NP (2008). Berry fruits for cancer prevention: current status and future prospects. *J agric Food Chem*, 56 (3) : 630-635.
- Serini S et al (2011) Docosahexaenoic acid reverts resistance to UV-induced apoptosis in human keratinocytes: involvement of COX-2 and HuR. *J Nutr Biochem*, 22 (9) : 874-885.
- Shan Q et al (2009). Purple sweet potato color ameliorates cognition deficits and attenuates oxidative damages and inflammation in aging mouse brain induced by d-galactose. *J Biomed Biotechnol*, 564737.
- Sharma AD et al (1999). Anthocyanin-DNA copigmentation complex: mutual protection against oxidative damage. *Phytochem*, 52:1313–8.
- Shukitt-Hale B et al (2008). Berry fruit supplementation and the aging brain. *J Agric Food Chem*, 56:636–41.
- Sies H et al (1995). Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am J Clin Nutr*, 62(6 Suppl):1315S-1321S.
- Spencer JP (2008). Food for thought: the role of dietary flavonoids in enhancing human memory, learning and neuro-cognitive performance. *Proc Nutr Soc*, 67 (2) 238-252.

- Stammati A et al (1999). Toxicity of Selected Plant Volatiles in Microbial and Mammalian Short-term Assays. *Food Chem. Toxicol.*
- Stanner SA et al (2003). A review of the epidemiological evidence for the ‘antioxidant hypothesis’. *Public Health Nutr*, 7 (3) : 407-422.
- Svobodová A et al (2009). Lonicera cerulea and Vaccinium myrtillus fruit polyphenols protect HaCaT keratinocytes against UVB-induced phototoxic stress and DNA damage. *J Dermatol Sci*, 56 (3) : 196-204.
- Svobodová A et al (2010). Solar radiation induced skin damage: review of protective and preventive options. *Int J Radiat Biol*, 86 (12) : 999-1030.
- Syed DN et al (2011). Differential activation of signaling pathways by UVA and UVB radiation in normal human epidermal keratinocytes. *Photochem Photobiol*, 88: 1184–1190.
- Takahashi M et al (2011). Cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) photolyase repairs ultraviolet-B-induced CPDs in rice chloroplast and mitochondrial DNA. *Plant J*, 66 (3) : 433-442.
- Takikawa M et al (2009). Dietary anthocyanin-rich bilberry extract ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity via activation of AMP-activated protein kinase in diabetic mice. *J Nutr*, 140 (3) : 527-33.
- Tarko T et al (2013.) Digestion and absorption of phenolic compounds assessed by in vitro simulation methods. A review. *Rocz Panstw Zakl Hig*, 64 (2) : 79-84.
- Terra VA et al (2011). Time-dependent reactive species formation and oxidative stress damage in the skin after UVB irradiation. *J Photochem Photobiol B*, 2;109:34-41.
- Triebel S et al (2012). Modulation of inflammatory gene expression by a bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) extract and single anthocyanins considering their limited stability under cell culture conditions. *J Agric Food Chem*, 60 (36) : 8902-8910.
- Tsai M-L et al (2011). Antimicrobial, Antioxidant, and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils from Five Selected Herbs. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75 (10), 1977-1983.

Tsuda T et al (2005). Microarray profiling of gene expression in human adipocytes in response to anthocyanins. *Biochem Pharmacol*, 71,1184–1197.

Ündeğer ü et al (2009). Antioxidant activities of major thyme ingredients and lack of (oxidative) DNA damage in V79 Chinese hamster lung fibroblast cells at low levels of carvacrol and thymol. *Food Chem. Toxicol.* 47, 2037–2043.

Urbach F (1989). Potential effects of altered solar ultraviolet radiation on human skin cancer. *Photochem Photobiol*, 50 (4) : 507-13.

Vafeiadou K et al (2009). The citrus flavanone naringenin inhibits inflammatory signalling in glial cells and protects against neuroinflammatory injury. *Arch Biochem Biophys*, 484 100-109.

Valko M et al (2004). Role of oxygen free radicals in DNA damage and incidence. *Mol Cell Biochem*, 266:37-56.

Valko M et al (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Review. *Chem Biol Interact.*160 (1) : 1-40.

Van Acker S et al (1995). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic Biol Med*, 20 (3) : 331-342.

VanLoon GW et al (2000). Environmental chemistry. Oxford University Press, Oxford

Vauzour D et al (2010). Polyphenols and human health: prevention of disease and mechanism of action. *Nutrients*, 2 (11) : 1106-1131.

Venu S et al (2013). Oxidation Reactions of Thymol: A Pulse Radiolysis and Theoretical Study. *J. Phys. Chem. A* 117, 291–299.

Viola G et al (2008). Central role of mitochondria and p53 in PUVA-induced apoptosis in human keratinocytes cell line NCTC-2544. *Toxicol Appl Pharmacol*, 227 84-96.

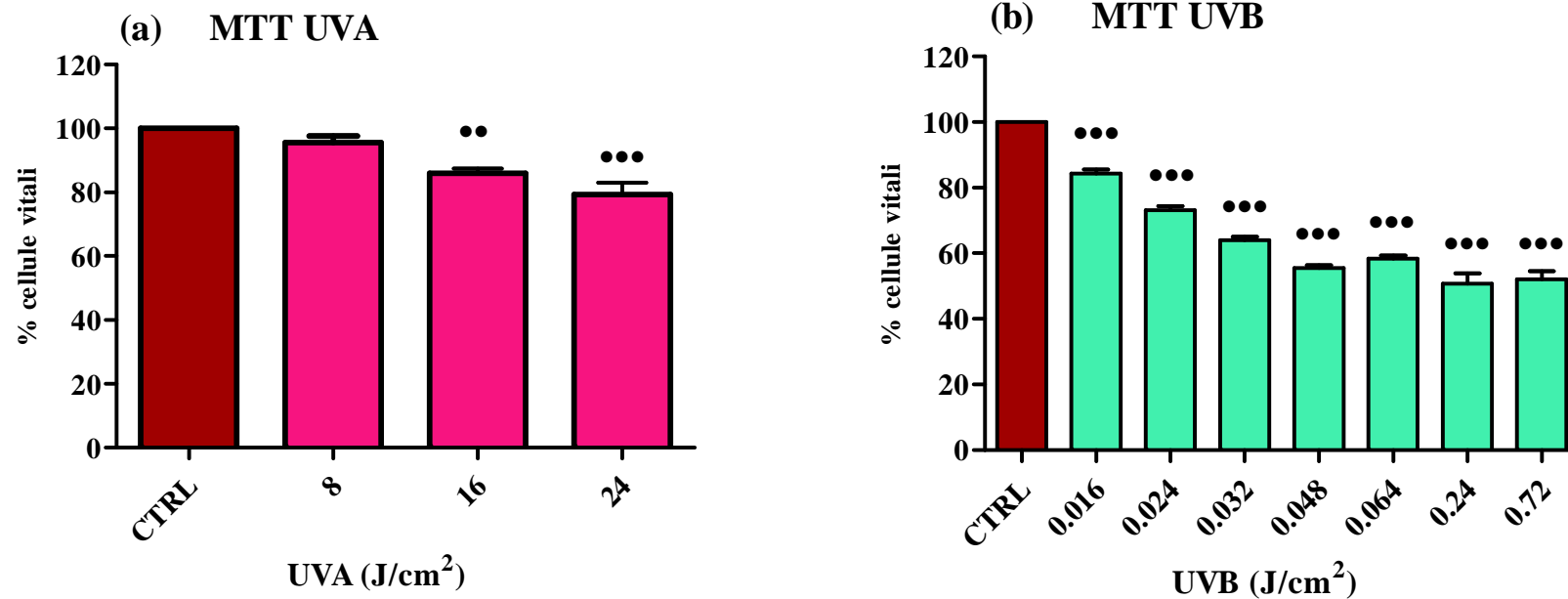
Wang CC et al (2013). Phototoxicity of zinc oxide nanoparticles in HaCaT keratinocytes-generation of oxidative DNA damage during UVA and visible light irradiation. *J Nanosci Nanotechnol*, 13 (6) : 3880-3888.

- Wang LS et al (2008). Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Lett*, 269(2):281-90.
- Wang H and Joseph JA (1999). Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 612–616.
- Wang KL et al (2013) Inhibitory effects of isoliquiritigenin on the migration and invasion of human breast cancer cells. *Expert Opin Ther Targets*, 17 (4) : 337-349.
- Wheeler DS et al (2004). Epigallocatechin-3-gallate, a green tea-derived polyphenol, inhibits IL-1 beta-dependent proinflammatory signal transduction in cultured respiratory epithelial cells. *J Nutr*, 134(5):1039-44.
- Wischermann K (2008). UVA radiation causes DNA strand breaks, chromosomal aberrations and tumorigenic transformation in HaCaT skin keratinocytes. *Oncogene*, 27 (31) : 4269-4280.
- Wolber R et al (2008). Pigmentation effects of solar-simulated radiation as compared with UVA and UVB radiation. *Pigment Cell Melanoma Res*, 21 (4) : 487-491.
- Woodward G et al (2009). Anthocyanin stability and recovery: implications for the analysis of clinical and experimental samples. *J Agric Food Chem*, 57 (12) : 5271-5278.
- Yam JC et al (2013). Ultraviolet light and ocular diseases. *Int Ophthalmol*, 24 (4) : 288-290.
- Yarosh DB et al (1999). Photoprotection by topical DNA repair enzymes: molecular correlates of clinical studies. *Photochem Photobiol*, 69 (2) : 136-140.
- Zhao Q et al (2008). The p38 mitogen-activated protein kinase augments nucleotide excision repair by mediating DDB2 degradation and chromatin relaxation. *J Biol Chem*, 283 (47) : 32553-32561.
- Zile MH (1998). Vitamin A and embryonic development: an overview. *J Nutr*, 128(2 Suppl):455S-458S.
- Zucco F et al (1996). *Colture cellulari in tossicologia*. Lombardo Editore, Roma.



# **FIGURE**

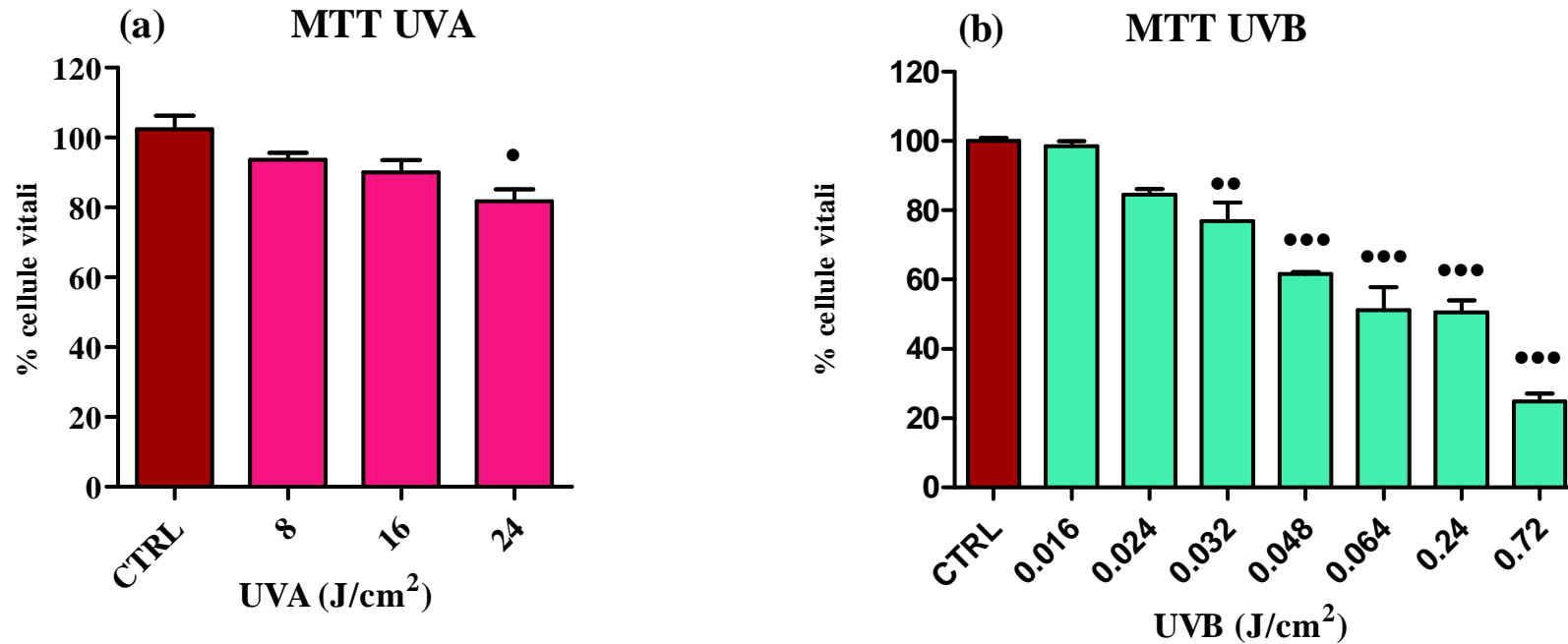
## TEST DI CITOTOSSICITA' -NCTC 2544-



\*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 vs CTRL

**Figura 12.** Valutazione della vitalità cellulare in cellule NCTC 2544 in seguito a trattamento con dosi scalari di UVA (a) o UVB (b) tramite Test dell'MTT eseguito 24 ore dopo la fine del trattamento. La vitalità è espressa come percentuale di cellule vitali rispetto al controllo negativo (cellule in PBS) a cui è attribuito il 100% di vitalità. I dati sono stati elaborati tramite test statistico One Way Anova (Dunnett's post hoc test).

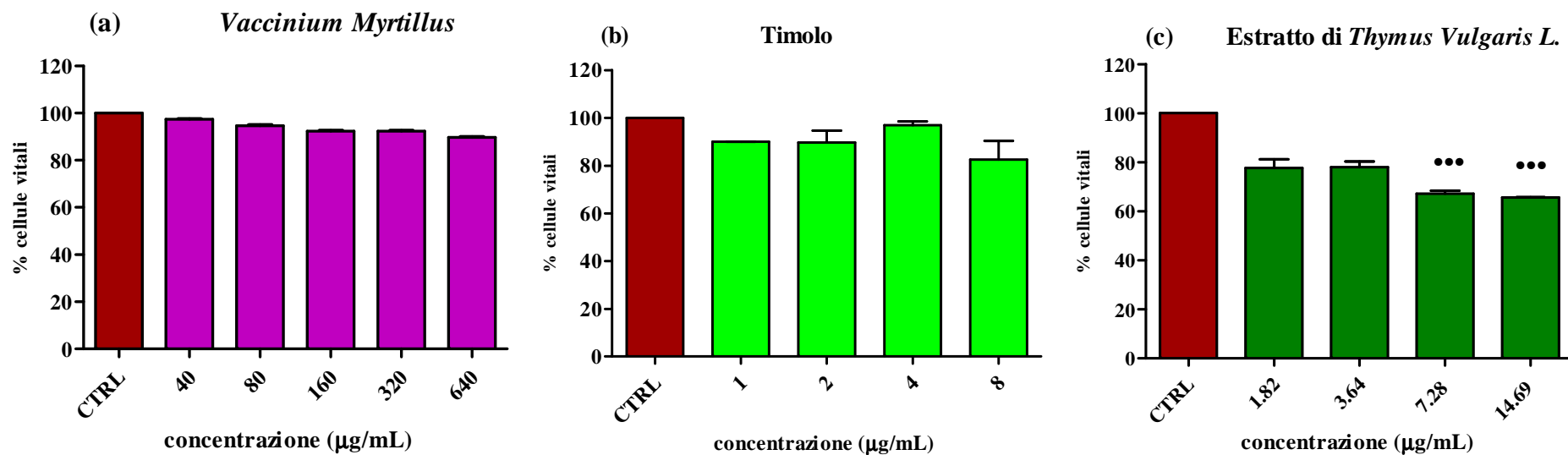
## TEST DI CITOTOSSICITA' -HaCaT-



•p<0.05, ••p<0.01, •••p<0.001 vs CTRL

**Figura 13.** Valutazione della vitalità cellulare in cellule HaCaT in seguito a trattamento con dosi scalari di UVA (a) o UVB (b) tramite Test dell'MTT eseguito 24 ore dopo la fine del trattamento. La vitalità è espressa come percentuale di cellule vitali rispetto al controllo negativo (cellule in PBS) a cui è attribuito il 100% di vitalità. I dati sono stati elaborati tramite test statistico One Way Anova (Dunnett's post hoc test).

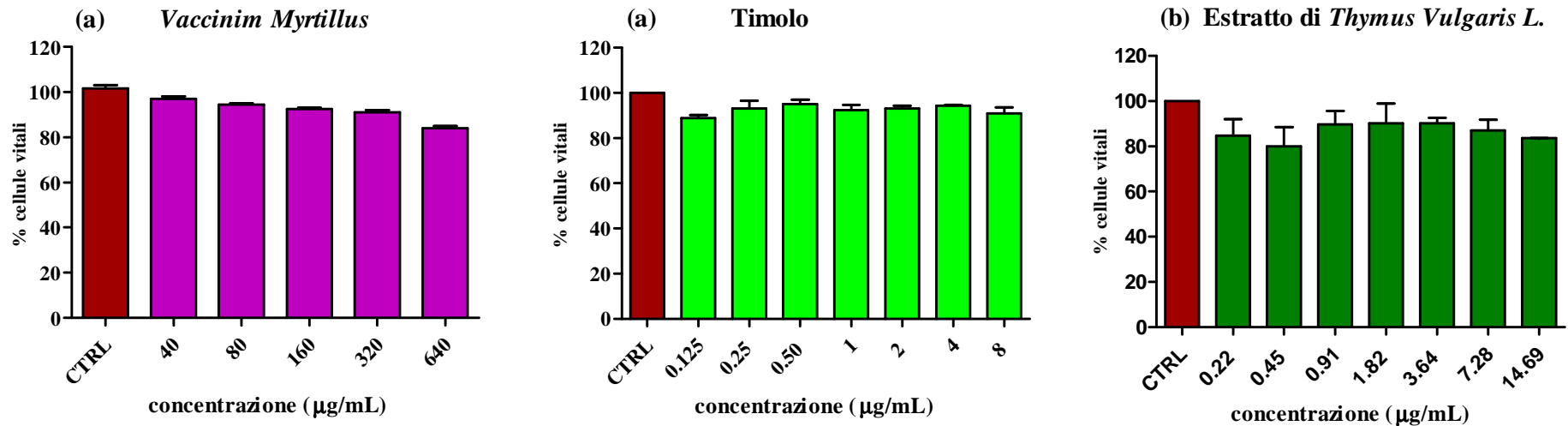
## TEST DI CITOTOSSICITA' -NCTC 2544-



\*\*\* p<0.001 vs CTRL

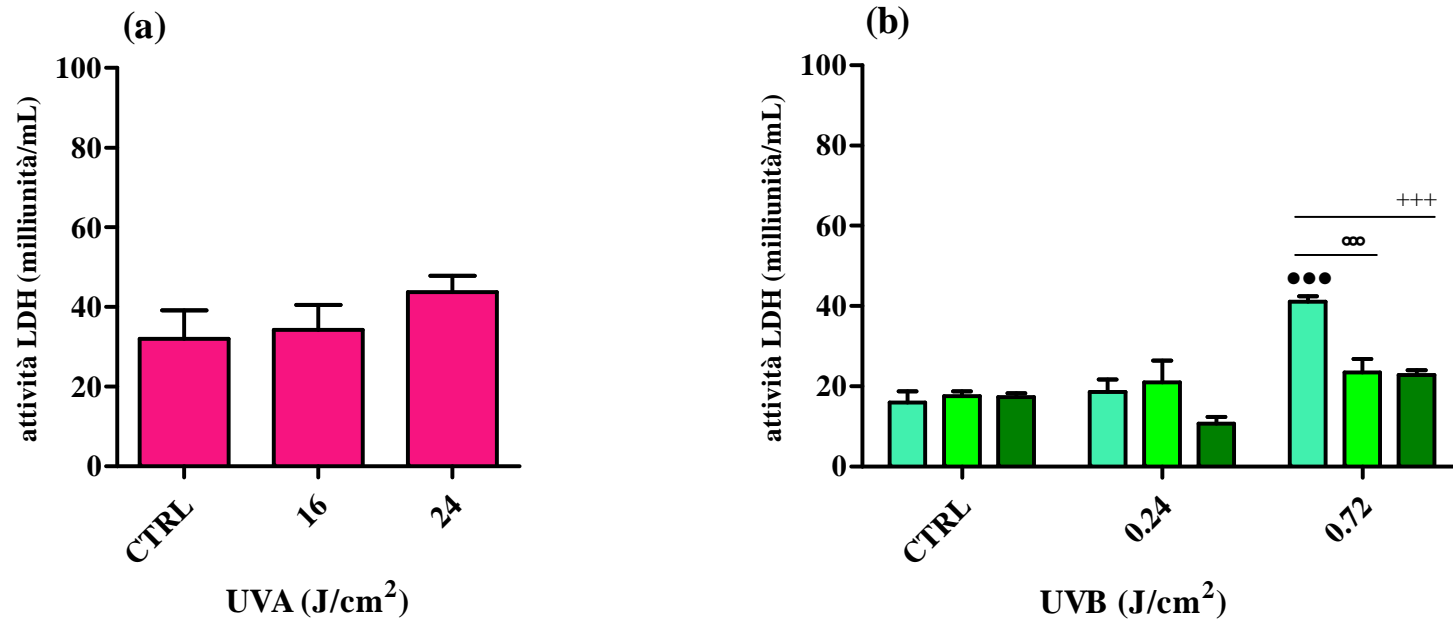
**Figura 14.** Valutazione della vitalità cellulare in cellule NCTC 2544 in seguito a trattamento di 1 ora con *Vaccinium Myrtillus* (a), Timolo (b) o Estratto di *Thymus Vulgaris L.* (c) tramite Test dell'MTT eseguito 24 ore dopo la fine del trattamento. La vitalità è espressa come percentuale rispetto al controllo negativo (RPMI 1640 per a; DMSO per b e c) a cui è attribuito il 100% di vitalità. I dati sono stati elaborati tramite test statistico One Way Anova (Dunnett's post hoc test).

## TEST DI CITOTOSSICITA' -HaCaT-



**Figura 15.** Valutazione della vitalità cellulare in cellule HaCaT in seguito a trattamento di 1 ora con *Vaccinium Myrtillus* (a), *Timolo* (b) o Estratto di *Thymus Vulgaris L.* (c) tramite Test dell'MTT eseguito 24 ore dopo la fine del trattamento. La vitalità è espressa come percentuale rispetto al controllo negativo (DMEM per a; DMSO per b e c) a cui è attribuito il 100% di vitalità. I dati sono stati elaborati tramite test statistico One Way Anova (Dunnett's post hoc test).

## TEST DI DANNO TISSUTALE (LDH ACTIVITY TEST, *EX VIVO*)



■ non pretrattati   
 ■ non pretrattati   
 ■ Timolo 1 µg/mL   
 ■ Thymus Vulgaris L. 1.82 µg/mL

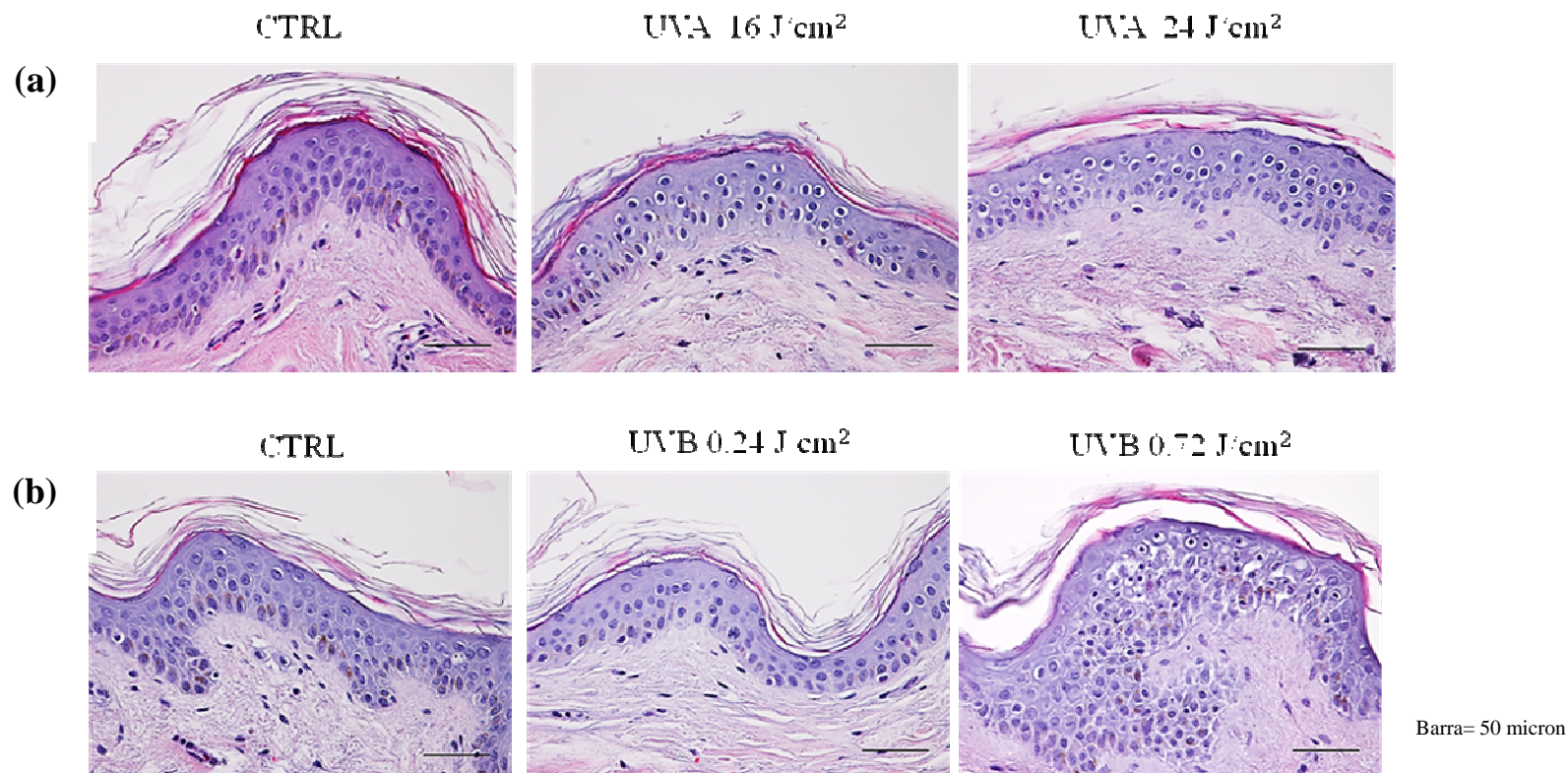
•••p<0.001 One Way Anova vs CTRL

°°°p<0.001 Two Way Anova vs non pretrattato

+++p<0.001 Two Way Anova vs non pretrattato

**Figura 16.** Valutazione dell'attività dell'enzima lattato deidrogenasi (LDH) in biopsie di cute umana effettuato 1 ora dopo trattamento con diverse dosi di UVA (a) e UVB (b) tramite kit (Sigma-aldrich). Valutazione della capacità protettiva di timolo ed estratto di *Thymus Vulgaris L.* dopo irradiazione delle biopsie con UVB (b). I risultati sono espressi come quantità di enzima che catalizza la conversione di lattato in piruvato per generare 1.0 µmole di NADH per minuto a 37°C. I dati sono stati elaborati con test statistico One Way Anova (Dunnett's post hoc test) e Two Way Anova (Bonferroni post hoc test).

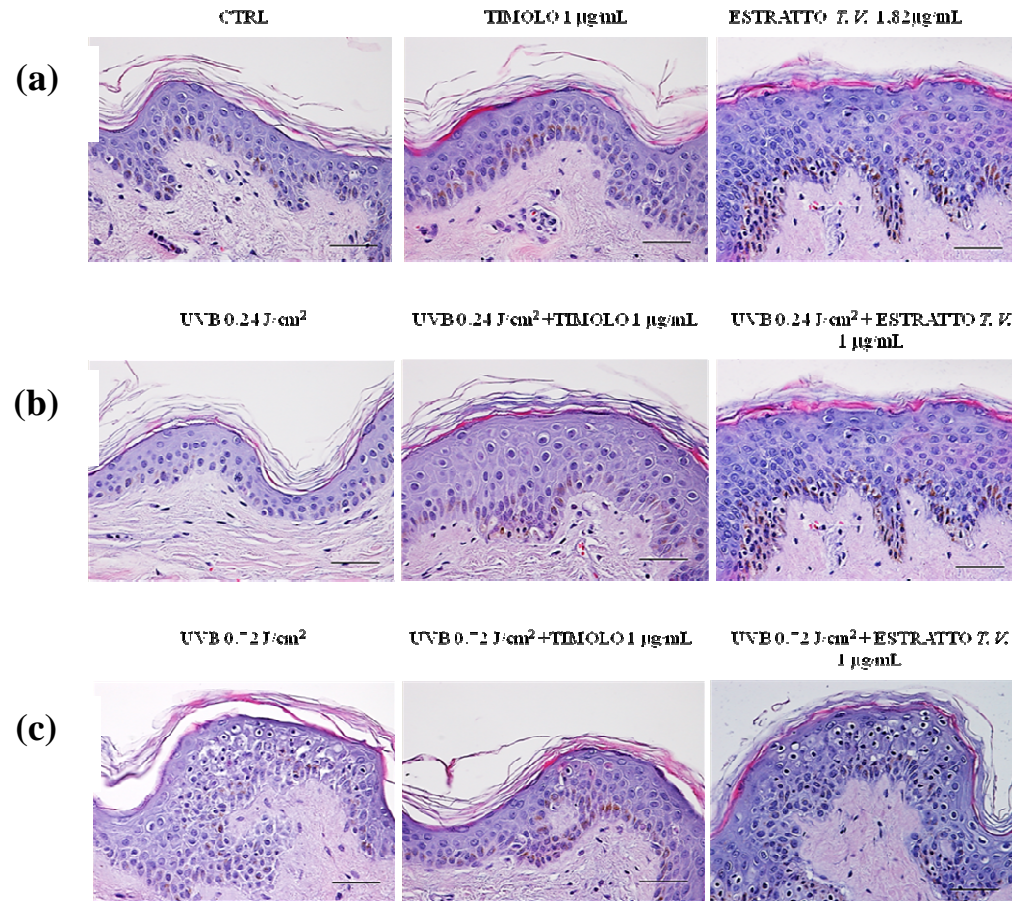
## ANALISI MORFOLOGICA TISSUTALE (Ematossilina-Eosina, EX VIVO)



**Figura 17.** Valutazione della morfologia di sezioni di cute umana dopo irradiazione con raggi UVA (a) o UVB (b). Valutazione eseguita mediante colorazione con Ematossilina-Eosina.

# ANALISI MORFOLOGICA TISSUTALE

## (Ematossilina-Eosina, EX VIVO)



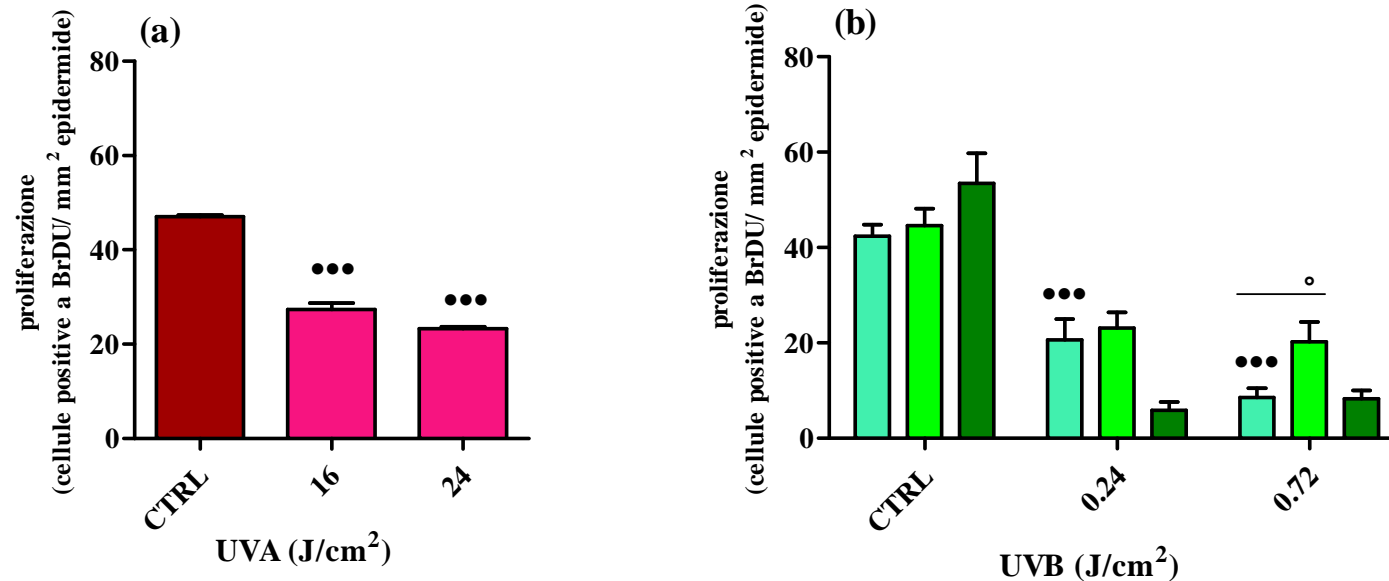
**Figura 18.** Valutazione della morfologia di sezioni di cute umana pretrattate 1 ora con timolo ed estratto di *Thymus Vulgaris L.* e successivamente irradiate con UVB. Valutazione eseguita mediante colorazione con Ematossilina Eosina.

Barra= 50 micron



# ANALISI DELLA PROLIFERAZIONE TISSUTALE

(Saggio con BrDU, EX VIVO)



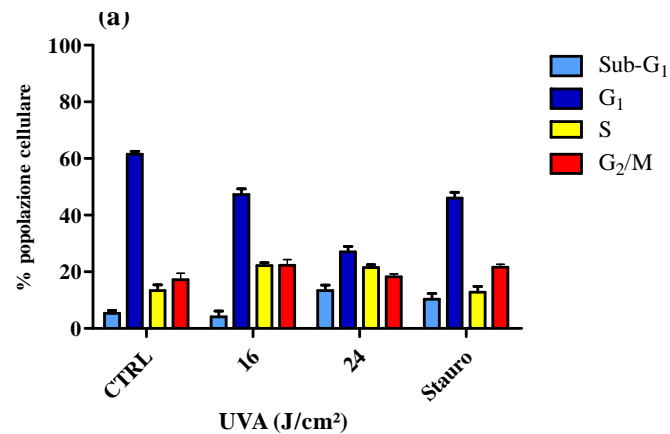
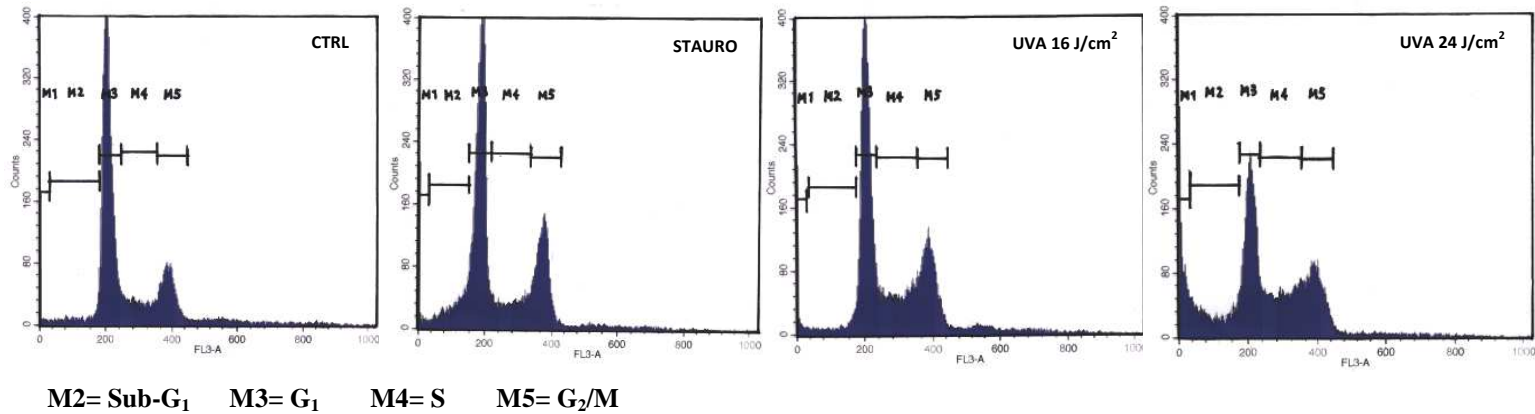
■ non pretrattati   ■ non pretrattati   ■ Timolo 1µg/mL   ■ Thymus Vulgaris L. 1.82 µg/mL

\*\*\*p<0.001 One Way Anova vs CTRL

°p<0.05 Two Way Anova vs non pretrattato

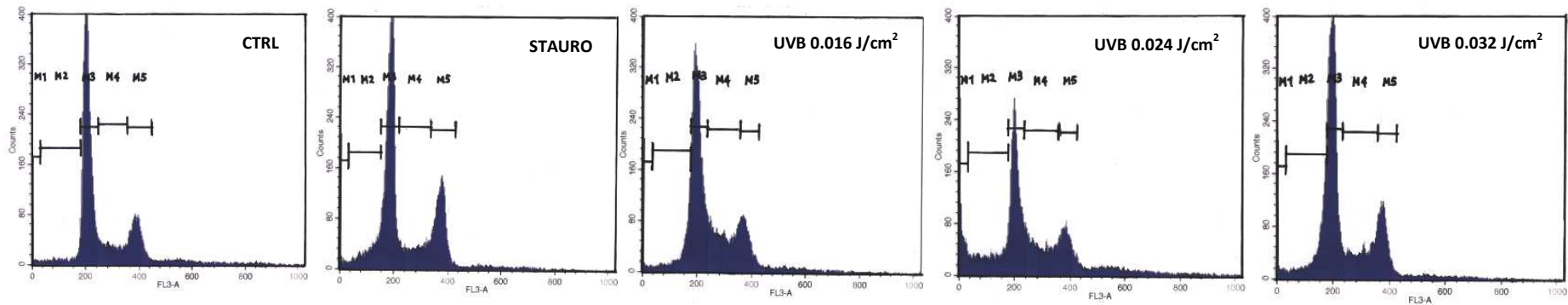
**Figura 19.** Analisi quantitativa della proliferazione di cellule epidermiche irradiate con UVA (a) o pretrattate per 1 ora con timolo ed estratto di *Thymus Vulgaris* L. e successivamente irradiate con UVB. I risultati sono espressi come media del numero di cellule positive a BrDU per mm<sup>2</sup> di epitelio vitale ± SD. I dati sono stati elaborati con test statistico One Way Anova (Dunnnett's post hoc test) e Two Way Anova (Bonferroni post hoc test).

## ANALISI DEL CICLO CELLULARE -NCTC 2544-

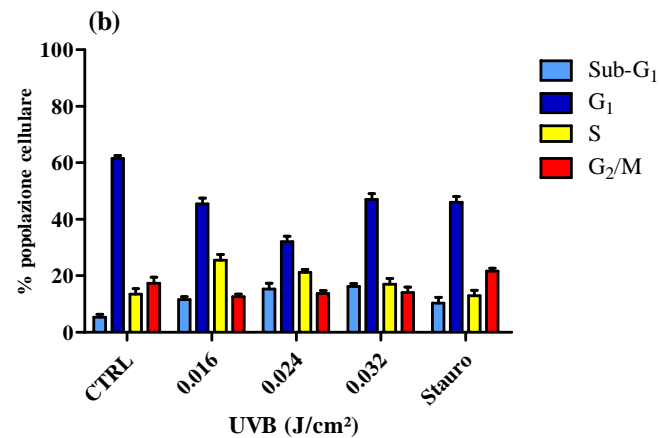


**Figura 20.** Valutazione della distribuzione cellulare della linea NCTC 2544 nelle diverse fasi del ciclo in seguito a trattamento con diverse dosi di UVA (a). I risultati sono espressi come percentuale di cellule in ciascuna fase.

## ANALISI DEL CICLO CELLULARE -NCTC 2544-

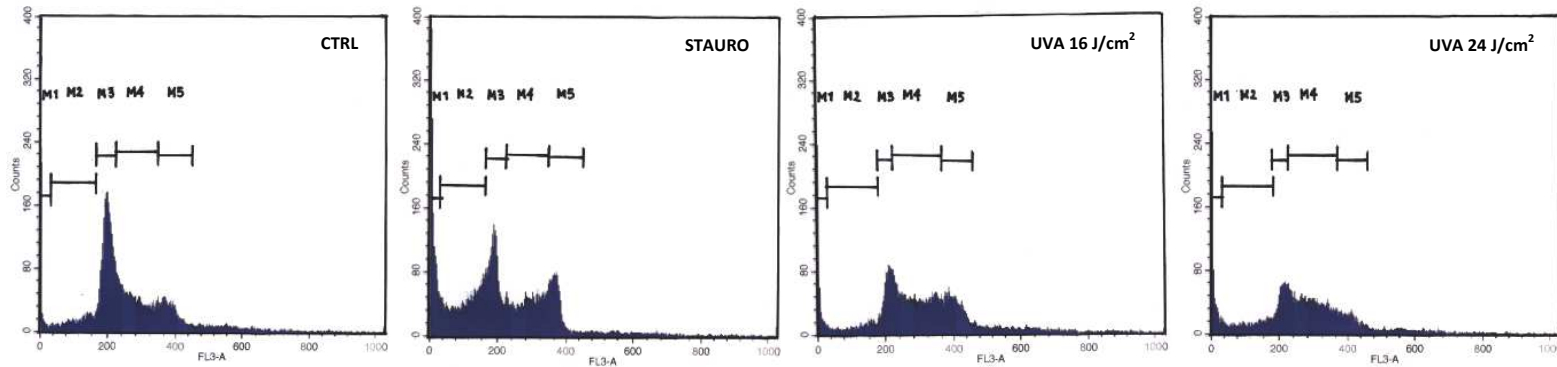


M2= Sub-G<sub>1</sub>    M3= G<sub>1</sub>    M4= S    M5= G<sub>2</sub>/M

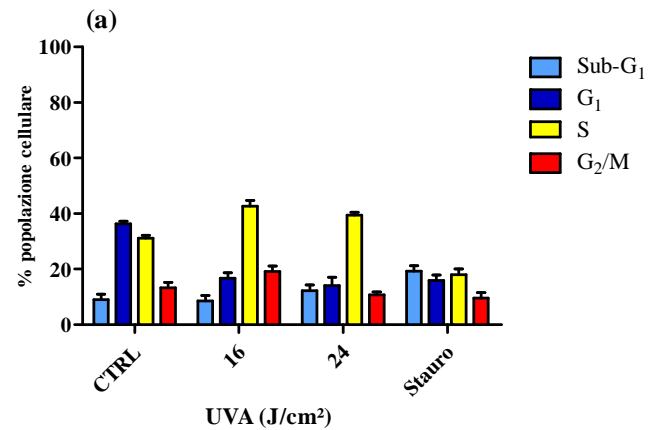


**Figura 21.** Valutazione della distribuzione cellulare della linea NCTC 2544 nelle diverse fasi del ciclo in seguito a trattamento con diverse dosi di UVB (b). I risultati sono espressi come percentuale di cellule in ciascuna fase.

## ANALISI DEL CICLO CELLULARE -HaCaT-

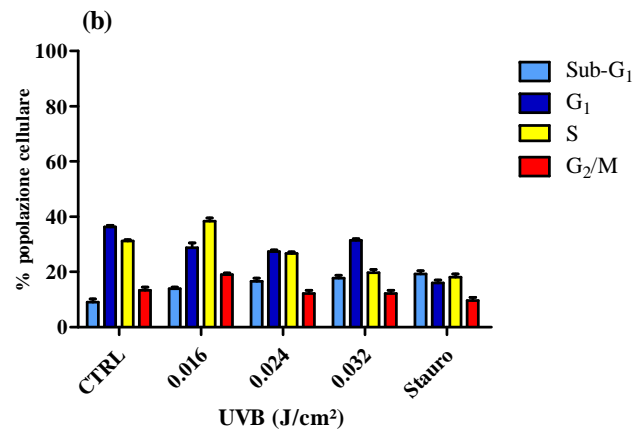
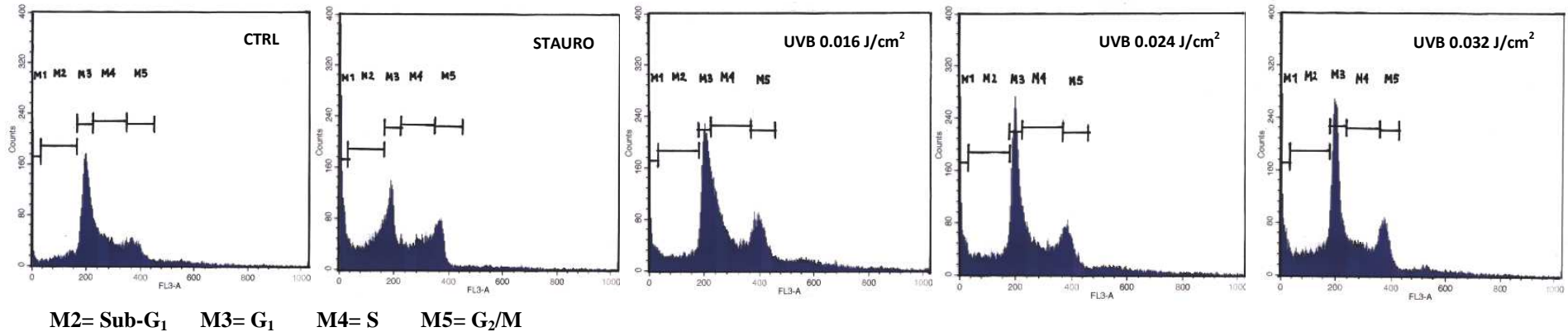


M2= Sub-G<sub>1</sub>    M3= G<sub>1</sub>    M4= S    M5= G<sub>2</sub>/M



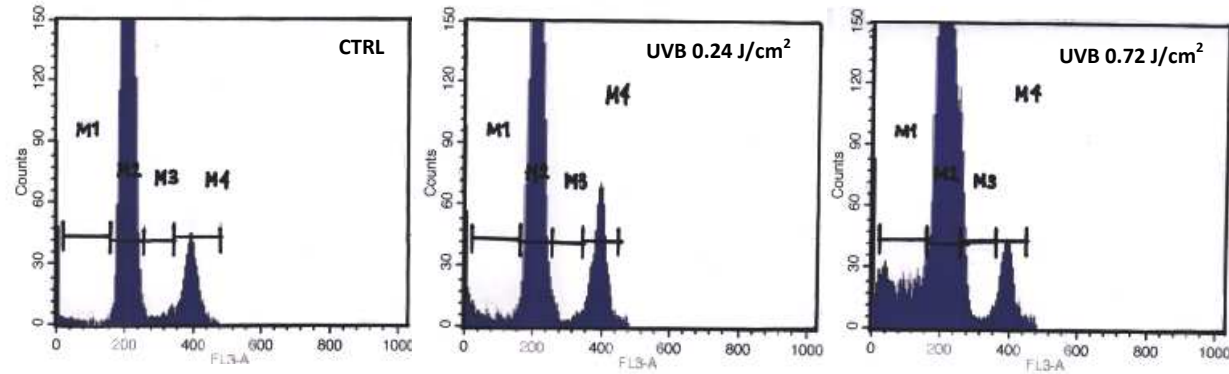
**Figura 22.** Valutazione della distribuzione cellulare della linea HaCaT nelle diverse fasi del ciclo in seguito a trattamento con diverse dosi di UVA (a). I risultati sono espressi come percentuale di cellule in ciascuna fase.

## ANALISI DEL CICLO CELLULARE -HaCaT-

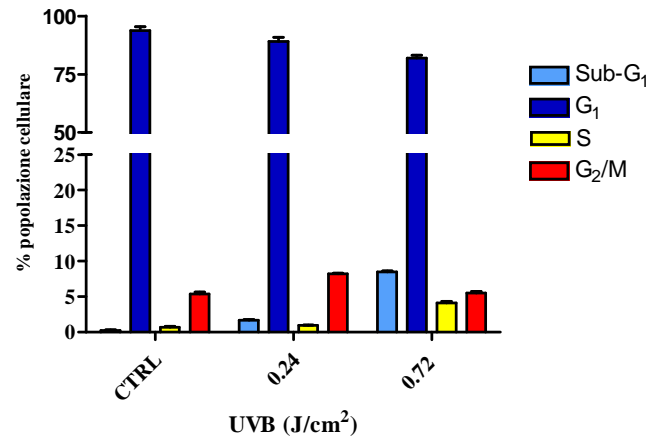


**Figura 23.** Valutazione della distribuzione cellulare della linea HaCaT nelle diverse fasi del ciclo in seguito a trattamento con diverse dosi di UVB (b). I risultati sono espressi come percentuale di cellule in ciascuna fase.

## ANALISI DEL CICLO CELLULARE -EX VIVO-

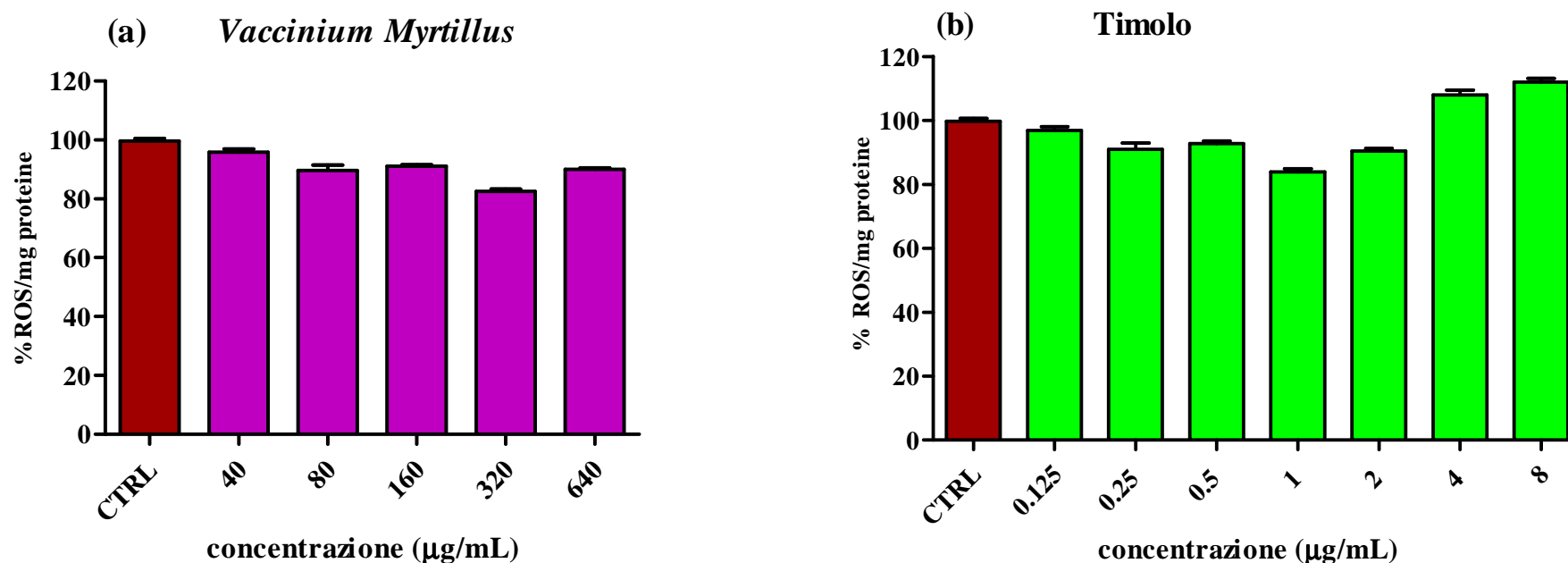


M2= Sub-G<sub>1</sub>    M3= G<sub>1</sub>    M4= S    M5= G<sub>2</sub>/M



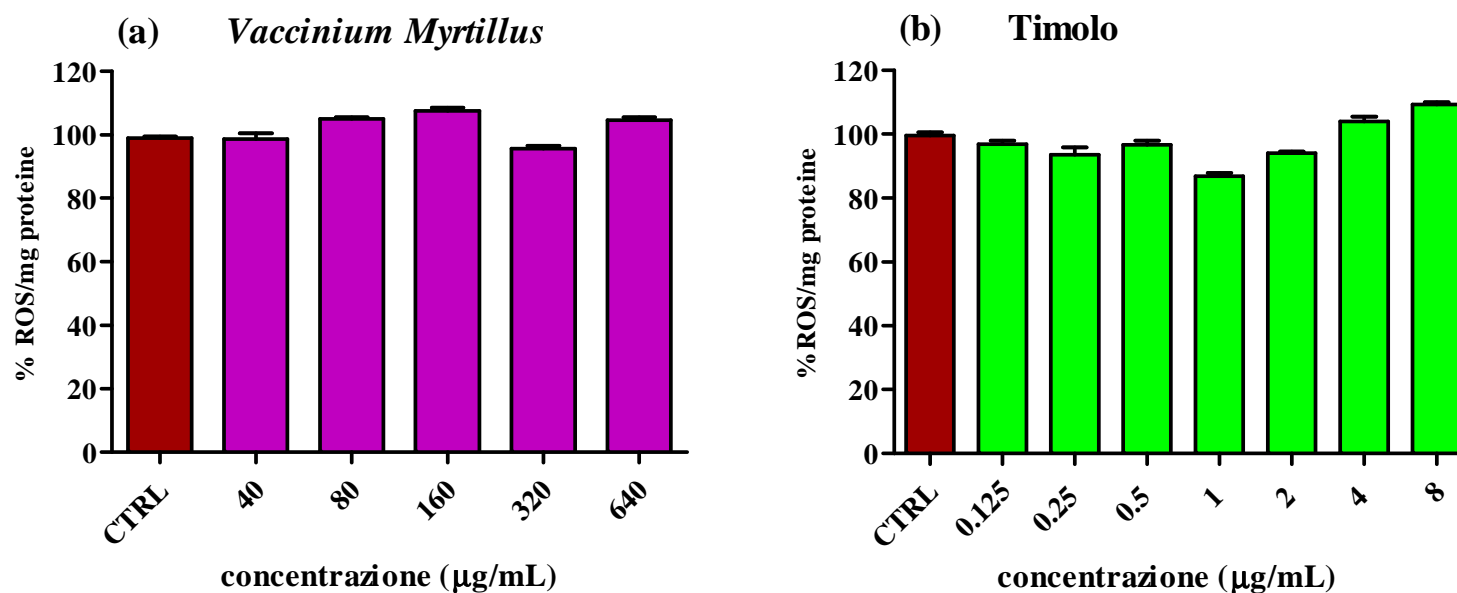
**Figura 24.** Valutazione della distribuzione cellulare di cellule estratte dallo strato epidermico di biopsia umana nelle diverse fasi del ciclo in seguito a trattamento con diverse dosi di UVB. I risultati sono espressi come percentuale di cellule in ciascuna fase.

## VALUTAZIONE DELLA PRODUZIONE DI SPECIE REATTIVE DELL'OSSIGENO DA PARTE DI *VACCINIUM MYRTILLUS* e TIMOLO -NCTC 2544-



**Figura 25.** Valutazione della produzione di specie reattive dell'ossigeno in cellule NCTC 2544 da parte di *Vaccinium Myrtillus* e Timolo. Le cellule sono state trattate con dosi crescenti di *Vaccinium Myrtillus* e Timolo per 1 ora. La quantità intracellulare di ROS è stata valutata tramite l'utilizzo della sonda fluorescente DCFH-DA. I valori di fluorescenza sono stati normalizzati sul quantitativo proteico (U.F./mg proteine) ed espressi come percentuale rispetto ai valori del controllo negativo (cellule non trattate con *Vaccinium Myrtillus* e Timolo).

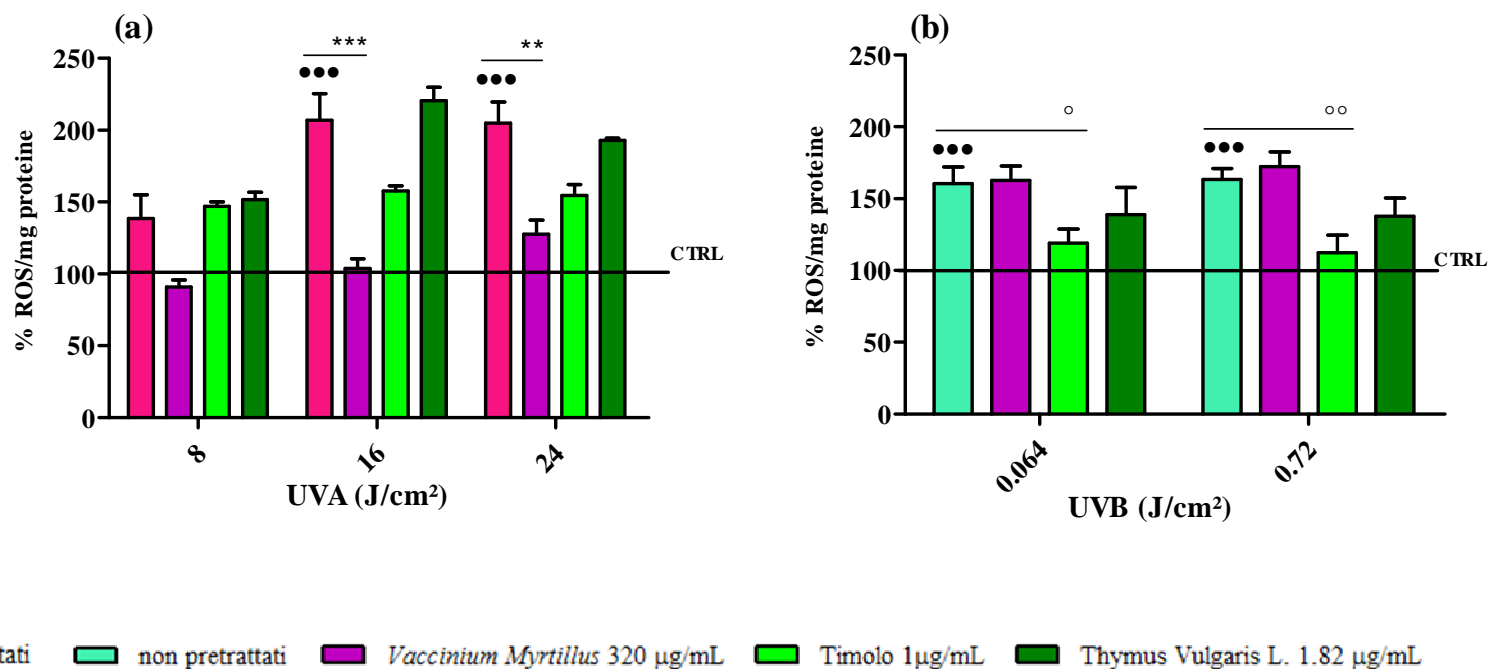
## VALUTAZIONE DELLA PRODUZIONE DI SPECIE REATTIVE DELL'OSSIGENO DA PARTE DI *VACCINIUM MYRTILLUS* e TIMOLO -HaCaT-



**Figura 26.** Valutazione della produzione di specie reattive dell'ossigeno in cellule HaCaT da parte di *Vaccinium Myrtillus* e Timolo. Le cellule sono state trattate con dosi crescenti di *Vaccinium Myrtillus* e Timolo per 1 ora. La quantità intracellulare di ROS è stata valutata tramite l'utilizzo della sonda fluorescente DCFH-DA. I valori di fluorescenza sono stati normalizzati sul quantitativo proteico (U.F./mg proteine) ed espressi come percentuale rispetto ai valori del controllo negativo (cellule non trattate con *Vaccinium Myrtillus* e Timolo).



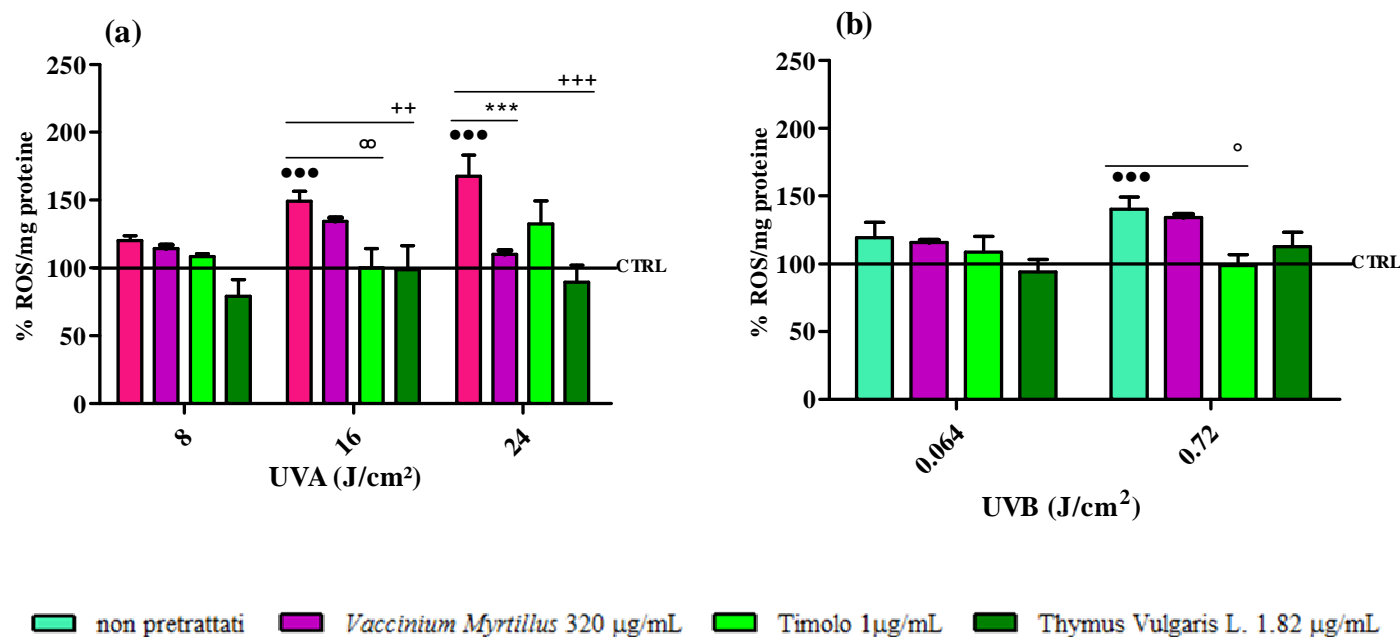
## VALUTAZIONE DELLA QUANTITA' INTRACELLULARE DI SPECIE REATTIVE DELL'OSSIGENO -NCTC 2544-



•••p<0.001 One Way Anova vs CTRL    \*\*p<0.01;\*\*\*p<0.001 Two Way Anova vs non pretrattato    °p<0.05; °°p<0.01 Two Way Anova vs non pretrattato

**Figura 27.** Valutazione della quantità intracellulare di specie reattive dell'ossigeno in cellule NCTC 2544 pretrattate per 1 ora con *Vaccinium Myrtillus*, Timolo o estratto di *Thymus Vulgaris L.* e sottoposte a diverse dosi di UVA (a) o UVB (b). La quantità intracellulare di ROS è stata valutata tramite l'utilizzo della sonda fluorescente DCFH-DA. I valori di fluorescenza sono stati normalizzati sul quantitativo proteico (U.F./mg proteine) ed espressi come percentuale rispetto ai valori del controllo. I dati sono stati elaborati con test statistico One Way Anova (Dunnett's post hoc test) e Two Way Anova (Bonferroni post hoc test).

## VALUTAZIONE DELLA QUANTITA' INTRACELLULARE DI SPECIE REATTIVE DELL'OSSIGENO -HaCaT-



•••p<0.001 One Way Anova vs CTRL

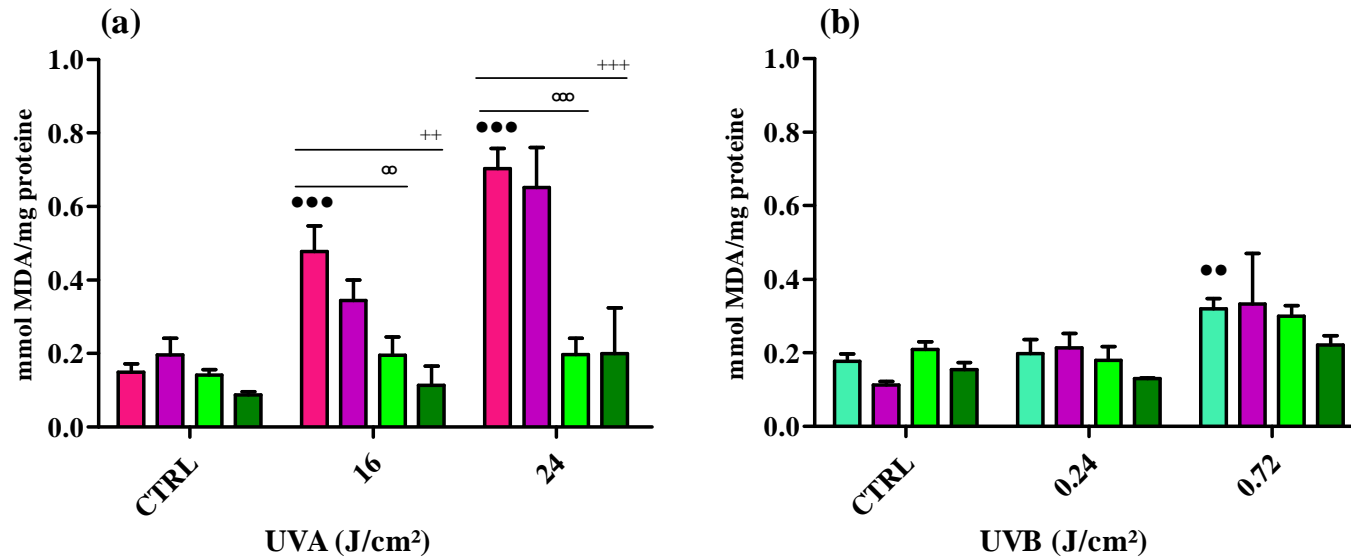
\*\*\*p<0.001 Two Way Anova vs non pretrattato

°p<0.05, °°p<0.01 Two Way Anova vs non pretrattato

++p<0.01, +++p<0.001 Two Way Anova vs non pretrattato

**Figura 28.** Valutazione della quantità intracellulare di specie reattive dell'ossigeno in cellule HaCaT pretrattate per 1 ora con *Vaccinium Myrtillus*, Timolo o estratto di *Thymus Vulgaris L.* e sottoposte a diverse dosi di UVA (a) o UVB (b). La quantità intracellulare di ROS è stata valutata tramite l'utilizzo della sonda fluorescente DCFH-DA. I valori di fluorescenza sono stati normalizzati sul quantitativo proteico (U.F./mg proteine) ed espressi come percentuale rispetto ai valori del controllo. I dati sono stati elaborati con test statistico One Way Anova (Dunnett's post hoc test) e Two Way Anova (Bonferroni post hoc test).

## TEST DI VALUTAZIONE DELLA LIPOPEROSSIDAZIONE -NCTC 2544-

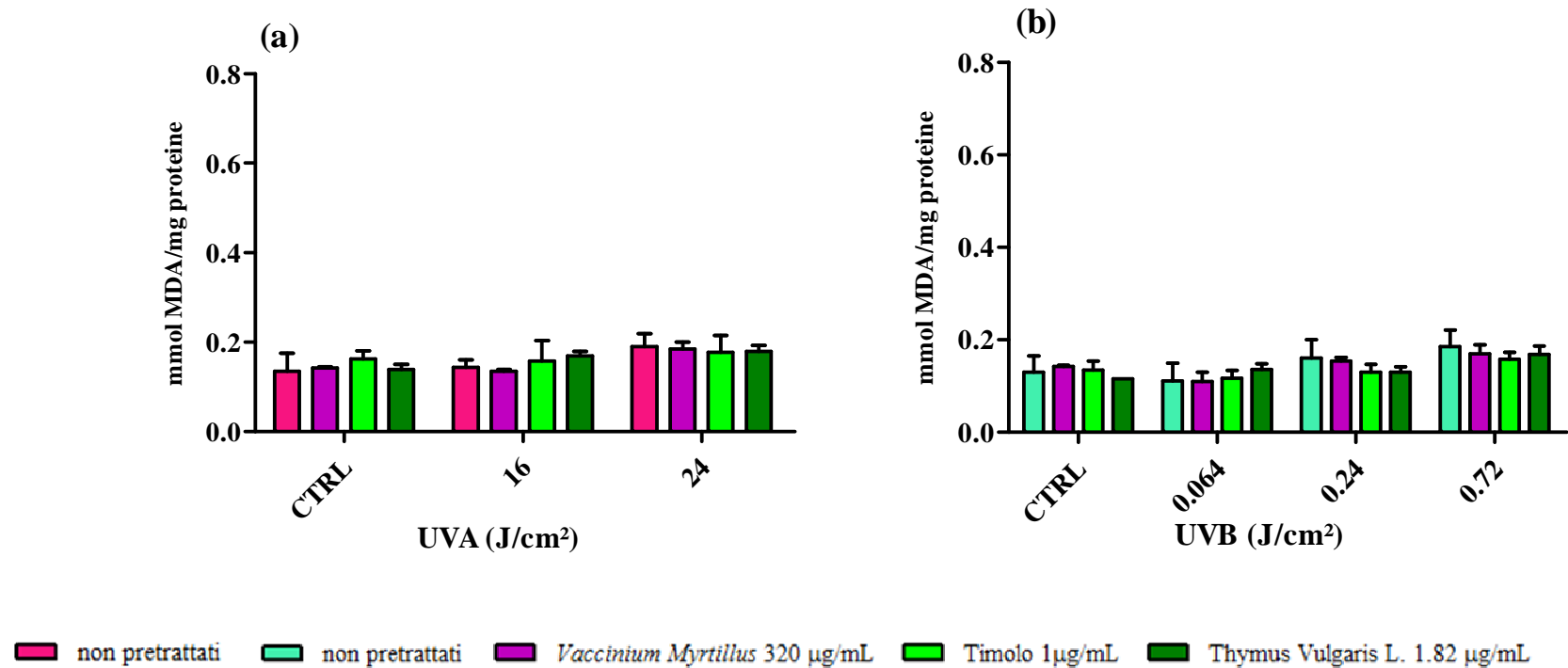


■ non pretrattati   
 ■ non pretrattati   
 ■ *Vaccinium Myrtillus* 320 µg/mL   
 ■ Timolo 1µg/mL   
 ■ *Thymus Vulgaris L.* 1.82 µg/mL

••p<0.01; •••p<0.001 One Way Anova vs CTRL   
 °°p<0.01, p<0.001 Two Way Anova vs non pretrattato   
 ++p<0.01; +++p<0.001 Two Way Anova vs vs non pretrattato

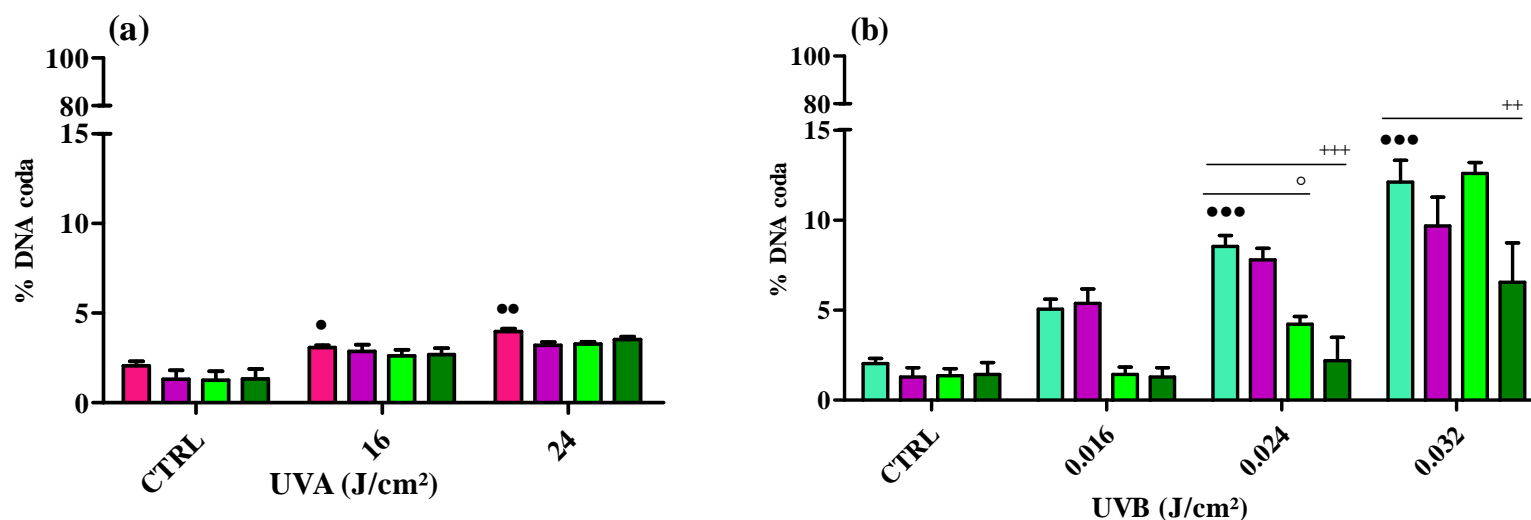
**Figura 29.** Valutazione della lipoperossidazione in cellule NCTC 2544 pretrattate per 1 ora con *Vaccinium Myrtillus*, Timolo o estratto di *Thymus Vulgaris L.* e sottoposte a diverse dosi di UVA (a) e UVB (b). La lipoperossidazione è stata valutata tramite quantificazione della malondialdeide (MDA) prodotta. I valori di fluorescenza rilevati sono stati normalizzati sul quantitativo proteico, interpolati su una curva standard ed espressi come µmoli MDA/mg di proteine. I dati sono stati elaborati con test statistico One Way Anova (Dunnett's post hoc test) e Two Way Anova (Bonferroni post hoc test).

## TEST DI VALUTAZIONE DELLA LIPOPEROSSIDAZIONE -HaCaT-



**Figura 30.** Valutazione della lipoperossidazione in cellule HaCaT pretrattate per 1 ora con *Vaccinium Myrtillus*, Timolo o estratto di *Thymus Vulgaris* L. e sottoposte a diverse dosi di UVA (a) e UVB (b). La lipoperossidazione è stata valutata tramite quantificazione della malondialdeide (MDA) prodotta. I valori di fluorescenza rilevati sono stati normalizzati sul quantitativo proteico, interpolati su una curva standard ed espressi come µmoli MDA/mg di proteine. I dati sono stati elaborati con test statistico One Way Anova (Dunnett's post hoc test) e Two Way Anova (Bonferroni post hoc test).

## TEST DI GENOTOSSICITA' (COMET TEST ALCALINO -NCTC 2544-)



■ non pretrattati   ■ non pretrattati   ■ *Vaccinium Myrtillus* 320 µg/mL   ■ Timolo 1µg/mL   ■ *Thymus Vulgaris L.* 1.82 µg/mL

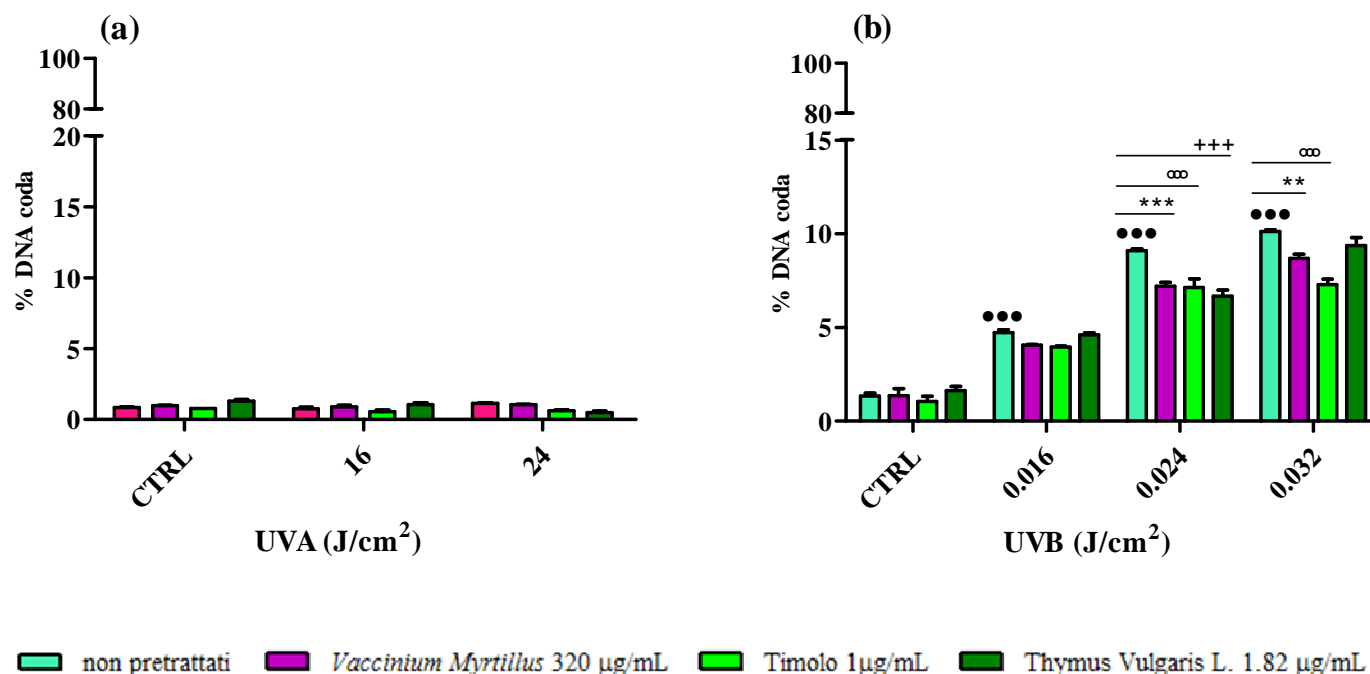
•p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 One Way Anova vs CTRL

°p<0.05 Two Way Anova vs non pretrattato

++p<0.01; +++p<0.001 Two Way Anova vs non pretrattato

**Figura 31.** Valutazione del danno genotossico in cellule NCTC 2544 pretrattate per 1 ora con *Vaccinium Myrtillus*, Timolo o estratto di *Thymus Vulgaris L.* e sottoposte a diverse dosi di UVA (a) o UVB (b). Il danno genotossico è stato valutato tramite comet alcalino (pH≥13) eseguito 24 ore dopo la fine dei trattamenti. Il danno al DNA è espresso come percentuale di DNA nella coda. I dati sono stati elaborati con test statistico One Way Anova (Dunnett's post hoc test) e Two Way Anova (Bonferroni post hoc test).

## TEST DI GENOTOSSICITA' (COMET TEST ALCALINO -HaCaT-)

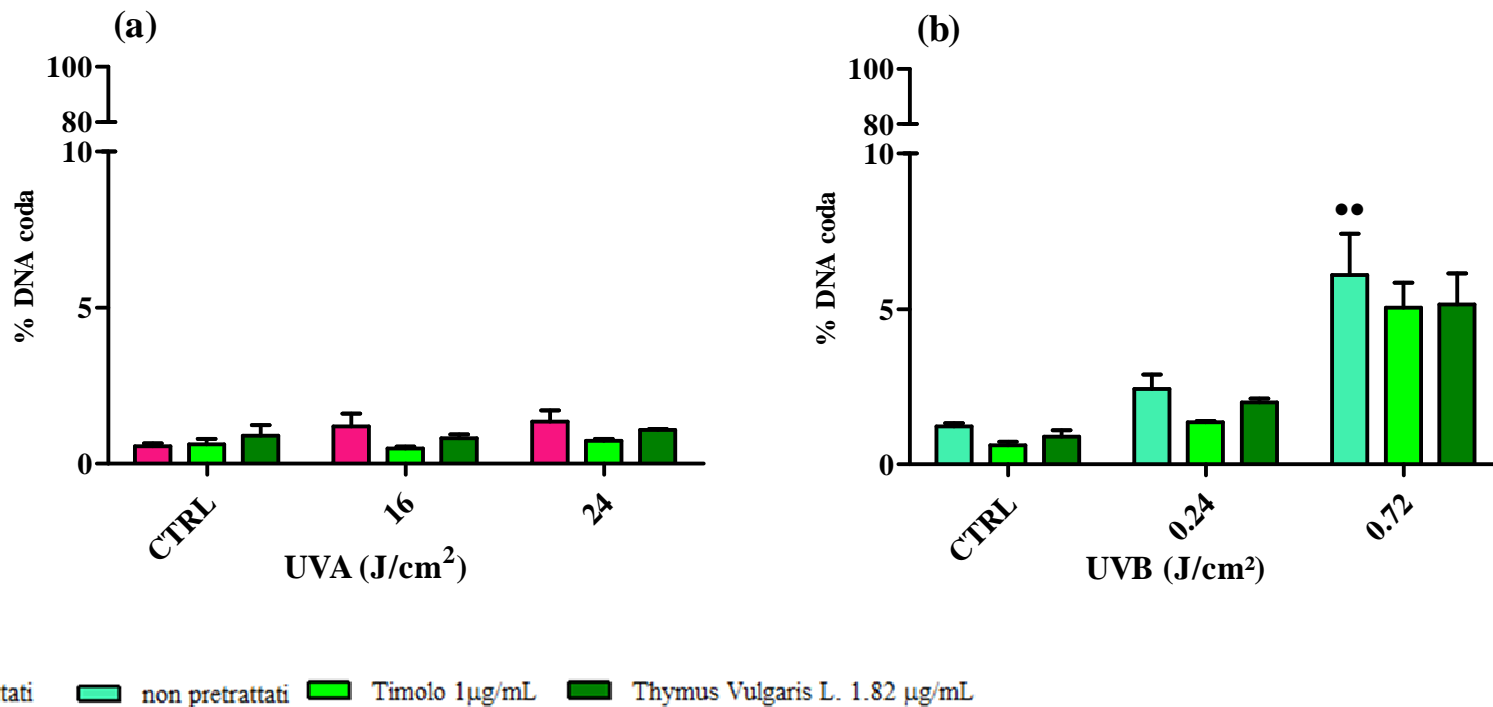


•••p<0.001 One Way Anova vs CTRL    \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 Two Way Anova vs non pretrattato    °°p<0.001 Two Way Anova vs non pretrattato

+++p<0.001 Two Way Anova vs non pretrattato

**Figura 32.** Valutazione del danno genotossico in cellule HaCaT pretrattate per 1 ora con *Vaccinium Myrtillus*, Timolo o estratto di *Thymus Vulgaris L.* e sottoposte a diverse dosi di UVA (a) o UVB (b). Il danno genotossico è stato valutato tramite comet alcalino (pH≥13) eseguito 24 ore dopo la fine dei trattamenti. Il danno al DNA è espresso come percentuale di DNA nella coda. I dati sono stati elaborati con test statistico One Way Anova (Dunnett's post hoc test) e Two Way Anova (Bonferroni post hoc test).

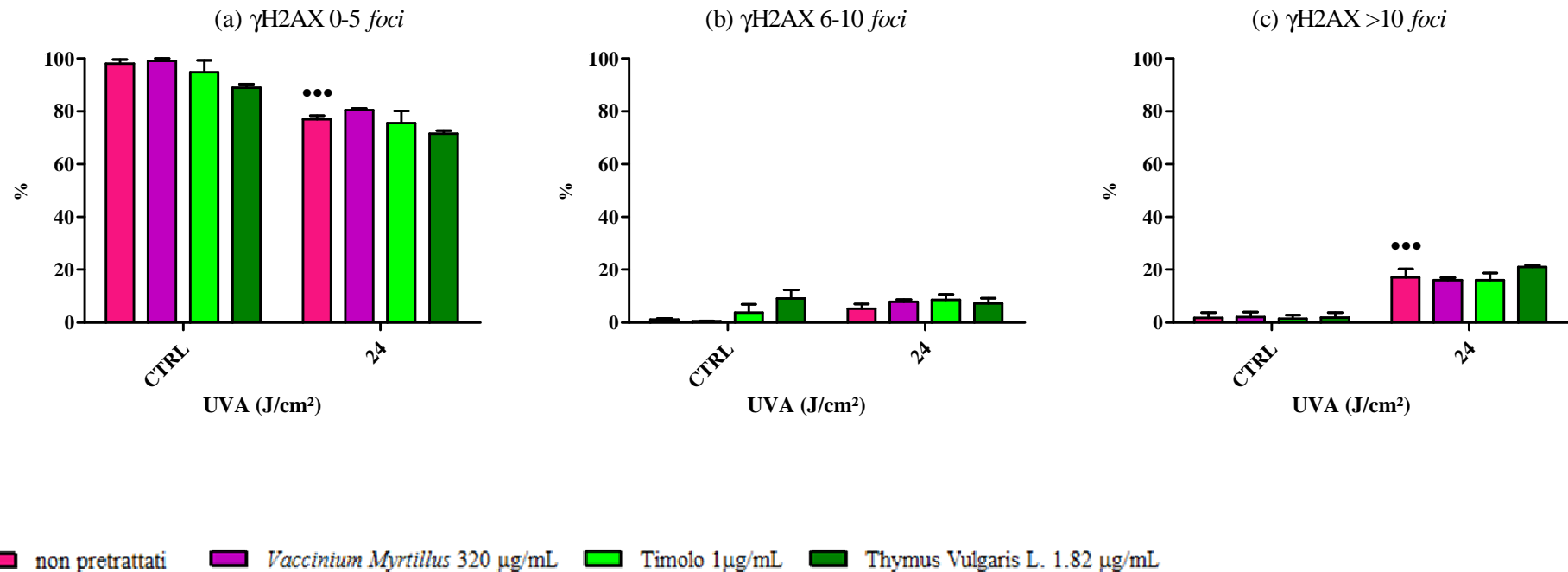
## TEST DI GENOTOSSICITA' (COMET TEST ALCALINO *EX VIVO*)



\*\*p<0.01 One Way Anova vs CTRL

**Figura 33.** Valutazione del danno genotossico in cellule estratte da biopsie di cute umana pretrattate per 1 ora con Timolo o estratto di *Thymus Vulgaris L.* e sottoposte a diverse dosi di UVA (a) o UVB (b). Il danno genotossico è stato valutato tramite comet alcalino (pH $\geq$ 13) eseguito 24 ore dopo la fine dei trattamenti ed espresso come percentuale di DNA nella coda. I dati sono stati elaborati con test statistico One Way Anova (Dunnett's post hoc test) e Two Way Anova (Bonferroni post hoc test).

## TEST DELL'ISTONE $\gamma$ H2AX -NCTC 2544-

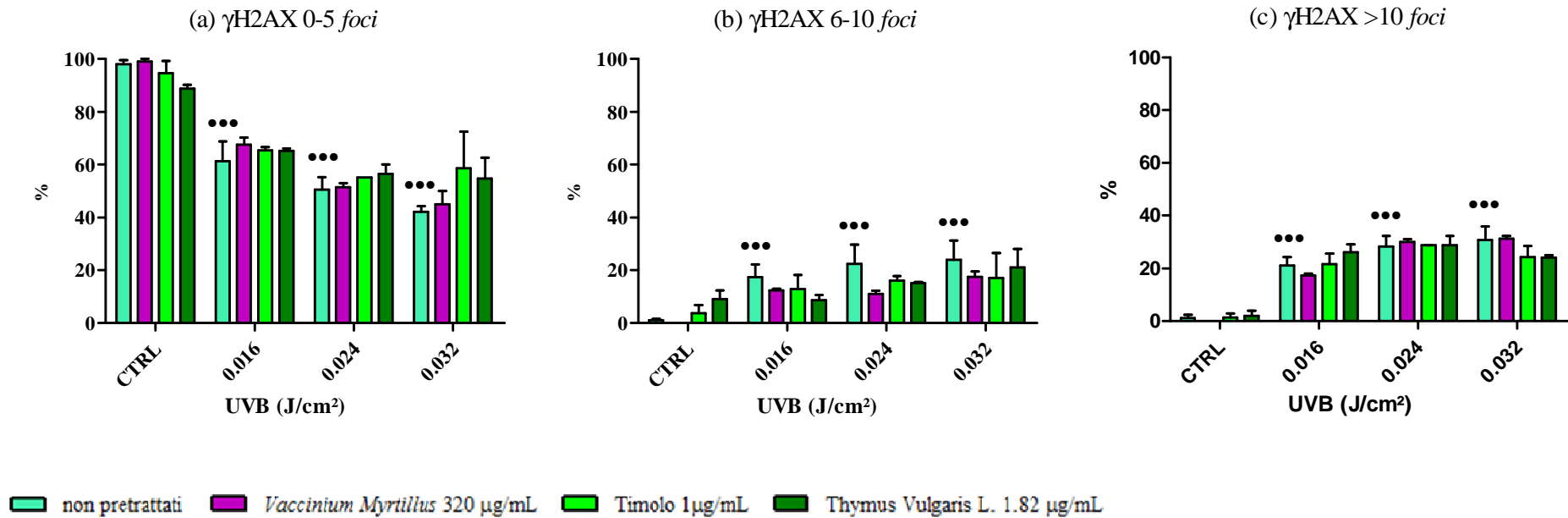


\*\*\*p<0.001 One Way Anova vs CTRL

**Figura 34.** Valutazione della presenza di danno al doppio filamento di DNA in cellule NCTC 2544 pretrattate per 1 ora con *Vaccinium Myrtillus*, Timolo o estratto di *Thymus Vulgaris L.* e sottoposte a diverse dosi di UVA. La presenza di DSBs è stata rilevata attraverso immunomarcatura dell'istone H2AX nella sua forma fosforilata ( $\gamma$ H2AX). I dati sono espressi come percentuale di cellule appartenenti a ciascuna fascia di classificazione (a, b, c) e sono stati elaborati con test statistico One Way Anova (Dunnett's post hoc test) e Two Way Anova (Bonferroni post hoc test).



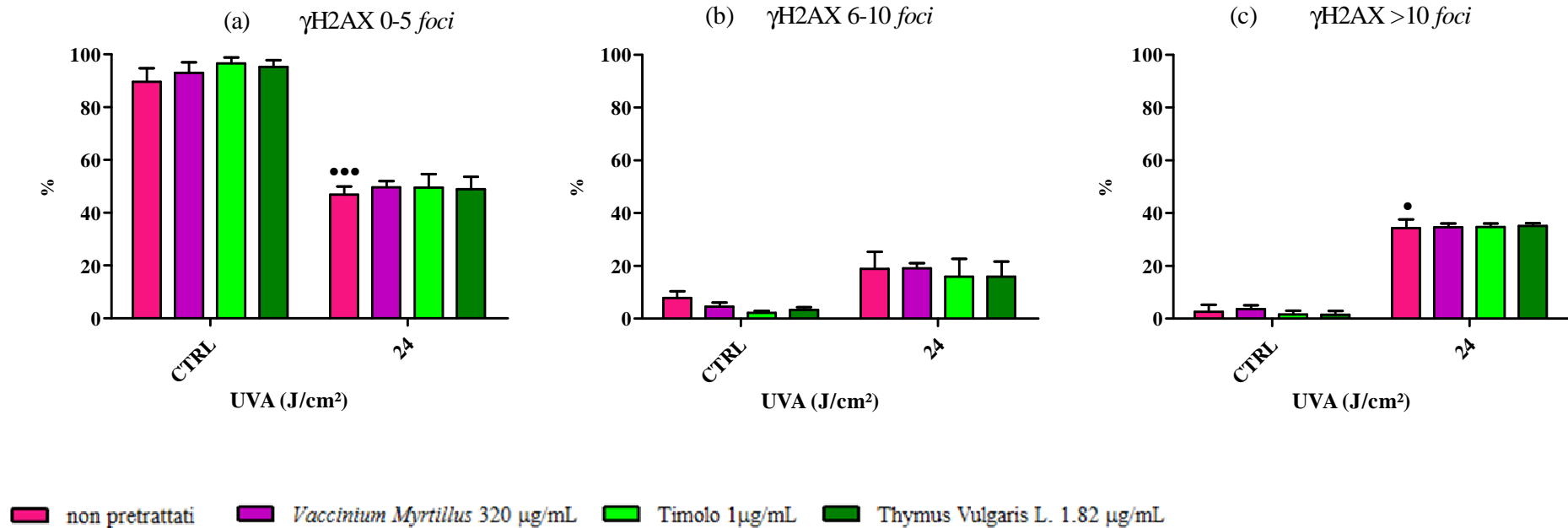
## TEST DELL'ISTONE $\gamma$ H2AX -NCTC 2544-



\*\*\*p<0.001 One Way Anova vs CTRL

**Figura 35.** Valutazione della presenza di danno al doppio filamento di DNA in cellule NCTC 2544 pretrattate per 1 ora con *Vaccinium Myrtillus*, Timolo o estratto di *Thymus Vulgaris* L. e sottoposte a diverse dosi di UVB. La presenza di DSBs è stata rilevata attraverso immunomarcatura dell'istone H2AX nella sua forma fosforilata ( $\gamma$ H2AX). I dati sono espressi come percentuale di cellule appartenenti a ciascuna fascia di classificazione (a, b, c) e sono stati elaborati con test statistico One Way Anova (Dunnett's post hoc test) e Two Way Anova (Bonferroni post hoc test).

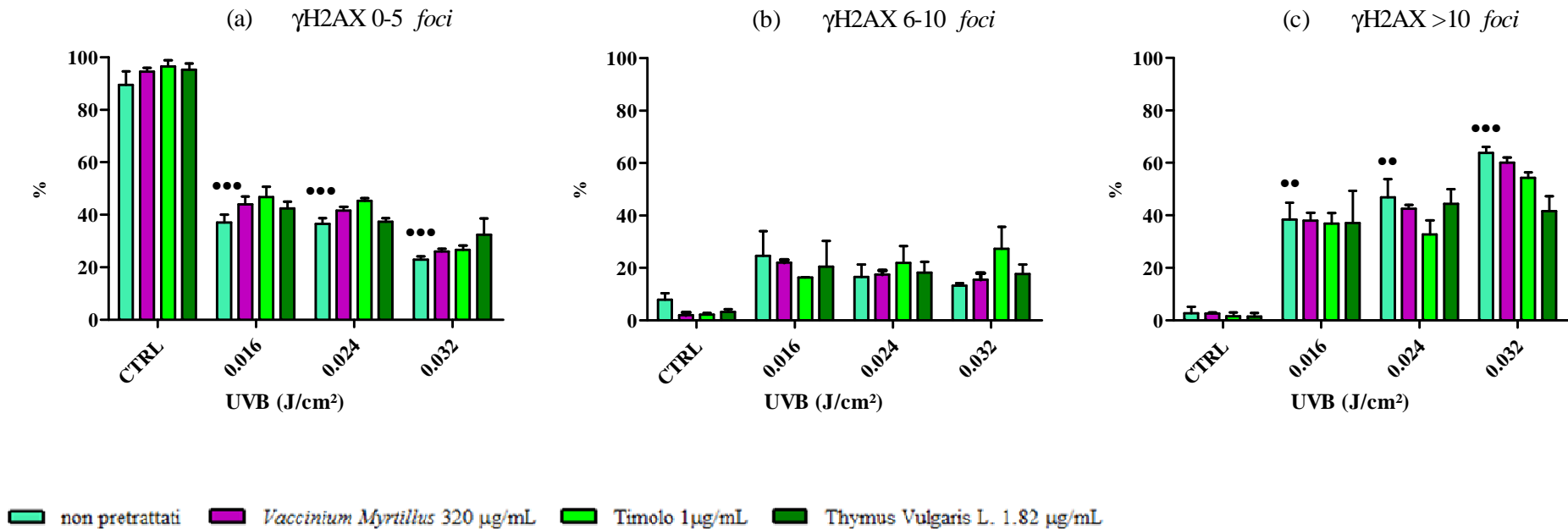
## TEST DELL'ISTONE $\gamma$ H2AX -HaCaT-



\*p<0.05, \*\*\*p<0.001 One Way Anova vs CTRL

**Figura 36.** Valutazione della presenza di danno al doppio filamento di DNA in cellule HaCaT pretrattate per 1 ora con *Vaccinium Myrtillus*, Timolo o estratto di *Thymus Vulgaris L.* e sottoposte a diverse dosi di UVA. La presenza di DSBs è stata rilevata attraverso immunomarcatura dell'istone H2AX nella sua forma fosforilata ( $\gamma$ H2AX). I dati sono espressi come percentuale di cellule appartenenti a ciascuna fascia di classificazione (a, b, c) e sono stati elaborati con test statistico One Way Anova (Dunnett's post hoc test) e Two Way Anova (Bonferroni post hoc test).

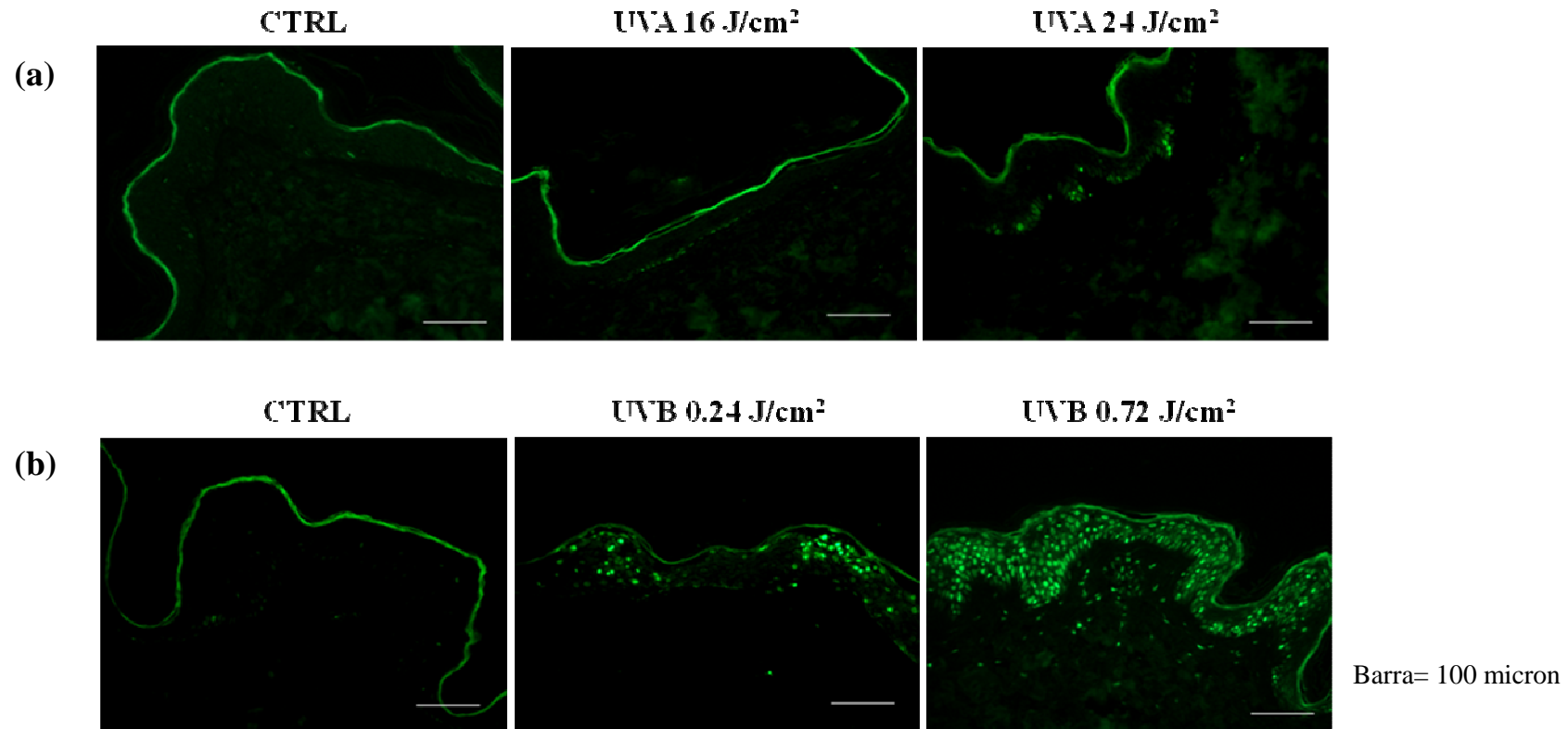
## TEST DELL'ISTONE $\gamma$ H2AX -HaCaT-



••p<0.01, •••p<0.001 One Way Anova vs CTRL

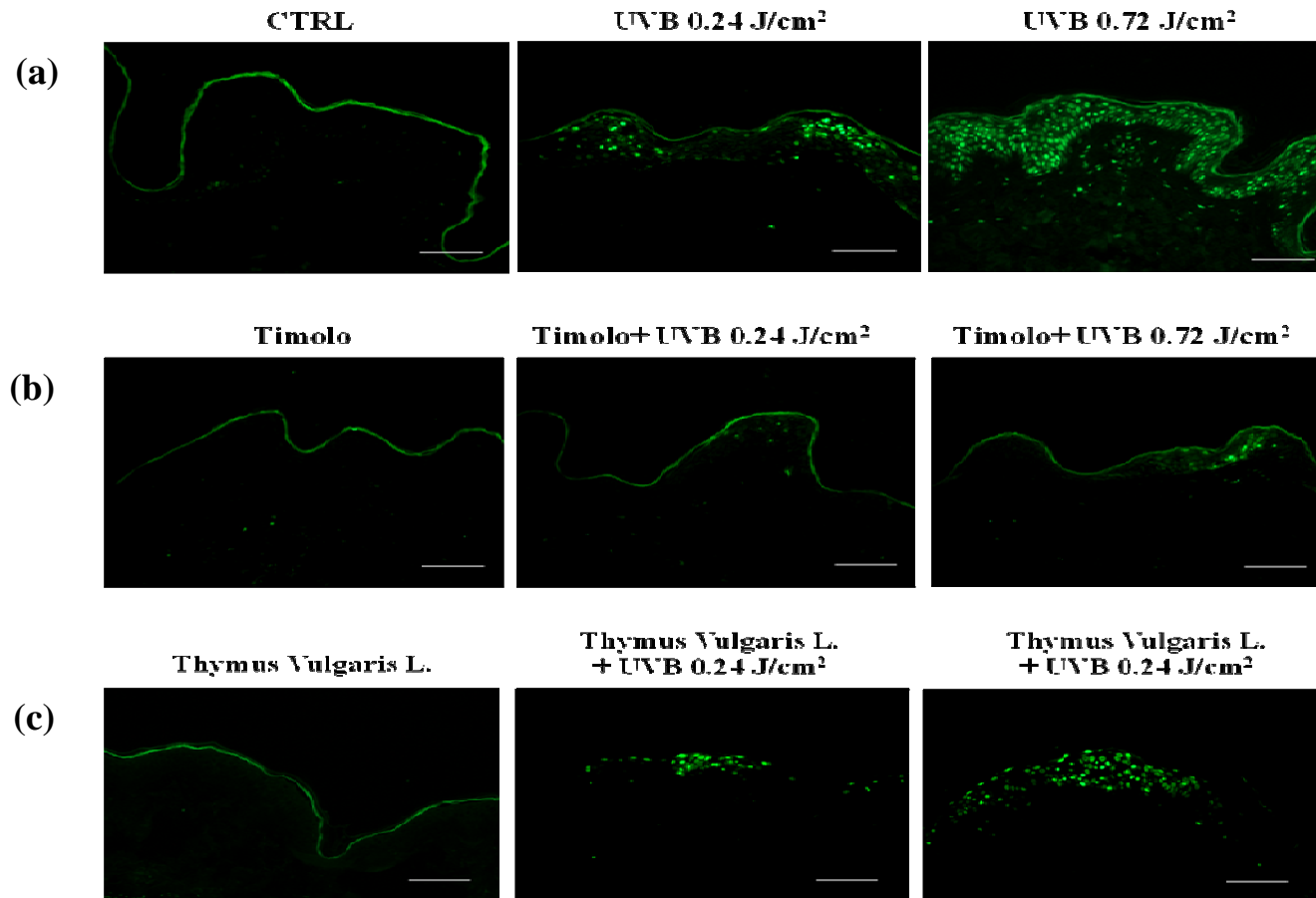
**Figura 37.** Valutazione della presenza di danno al doppio filamento di DNA in cellule HaCaT pretrattate per 1 ora con *Vaccinium Myrtillus*, Timolo o estratto di *Thymus Vulgaris L.* e sottoposte a diverse dosi di UVB. La presenza di DSBs è stata rilevata attraverso immunomarcatura dell'istone H2AX nella sua forma fosforilata ( $\gamma$ H2AX). I dati sono espressi come percentuale di cellule appartenenti a ciascuna fascia di classificazione (a, b, c) e sono stati elaborati con test statistico One Way Anova (Dunnett's post hoc test) e Two Way Anova (Bonferroni post hoc test).

## TEST DELL'ISTONE $\gamma$ H2AX -EX VIVO-



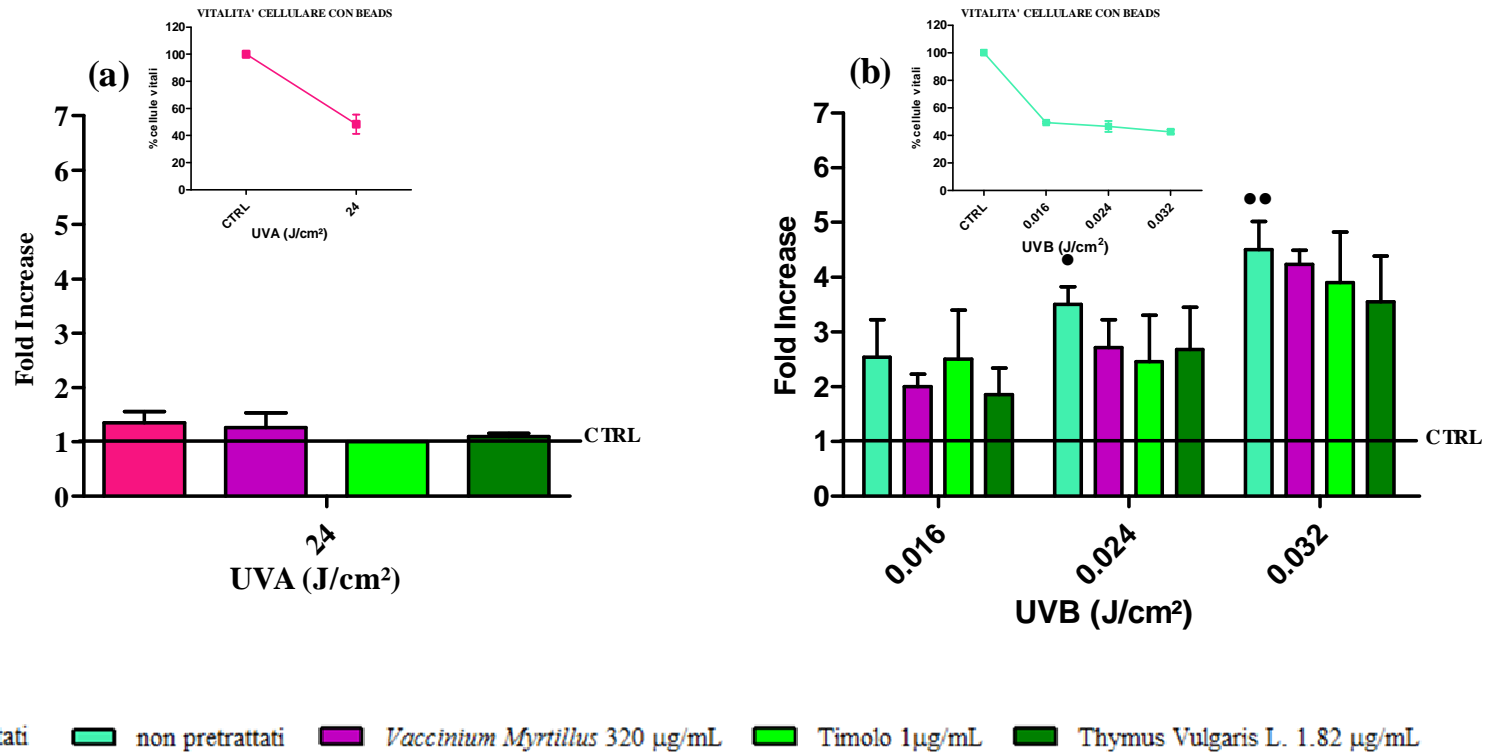
**Figura 38.** Valutazione della presenza di danno al doppio filamento di DNA in sezioni paraffinate sottoposte a diverse dosi di UVA (a) o UVB (b). La presenza di DSBs è stata rilevata attraverso immunomarcatura dell'istone H2AX nella sua forma fosforilata ( $\gamma$ H2AX).

## TEST DELL'ISTONE $\gamma$ H2AX -EX VIVO-



**Figura 39.** Valutazione della presenza di danno al doppio filamento di DNA in sezioni paraffinate di cute pretrattate per 1 ora con Timolo o estratto di *Thymus Vulgaris L.* e sottoposte a diverse dosi di UVB. La presenza di DSBs è stata rilevata attraverso immunomarcatura dell'istone H2AX nella sua forma fosforilata ( $\gamma$ H2AX).

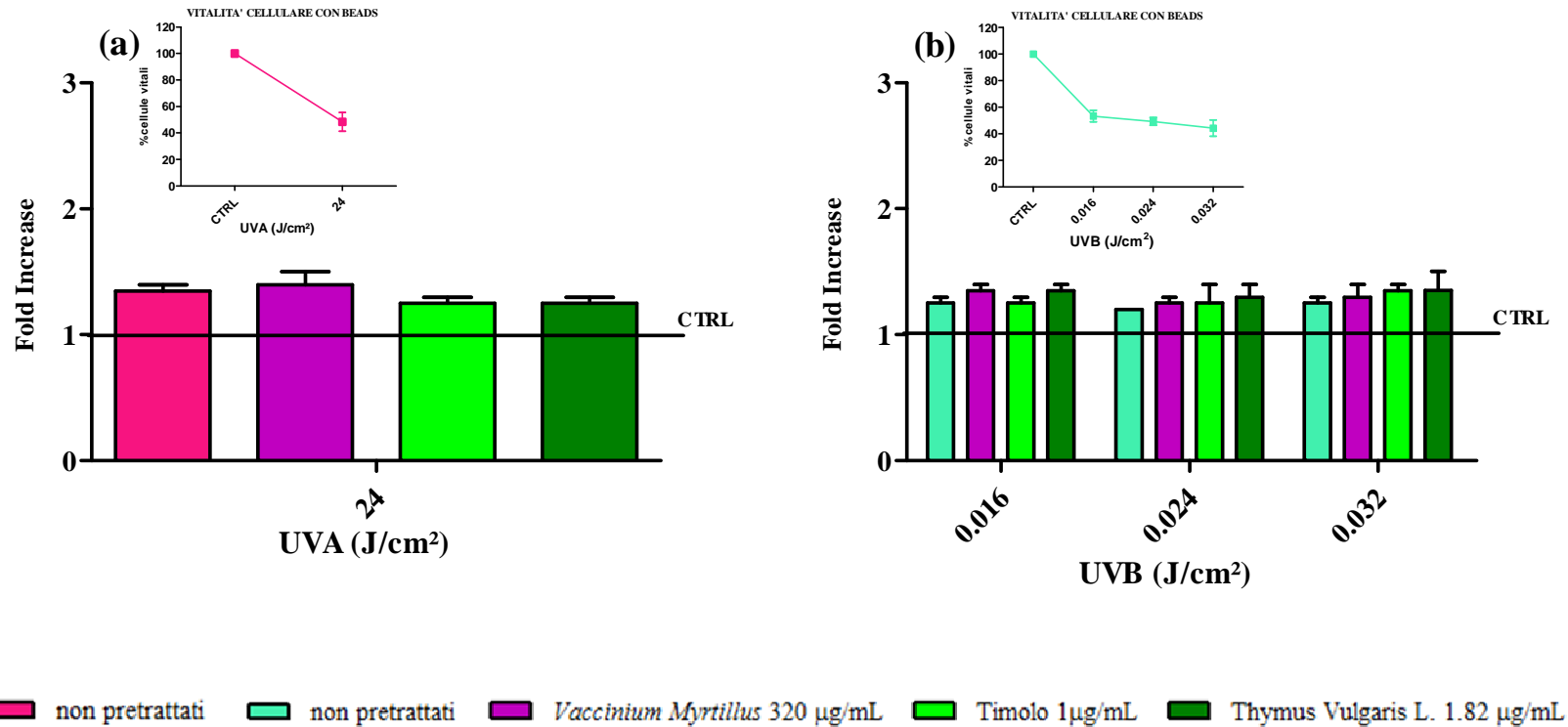
## TEST DEL MICRONUCLEO -NCTC 2544-



•p<0.05, ••p<0.01 One Way Anova vs CTRL

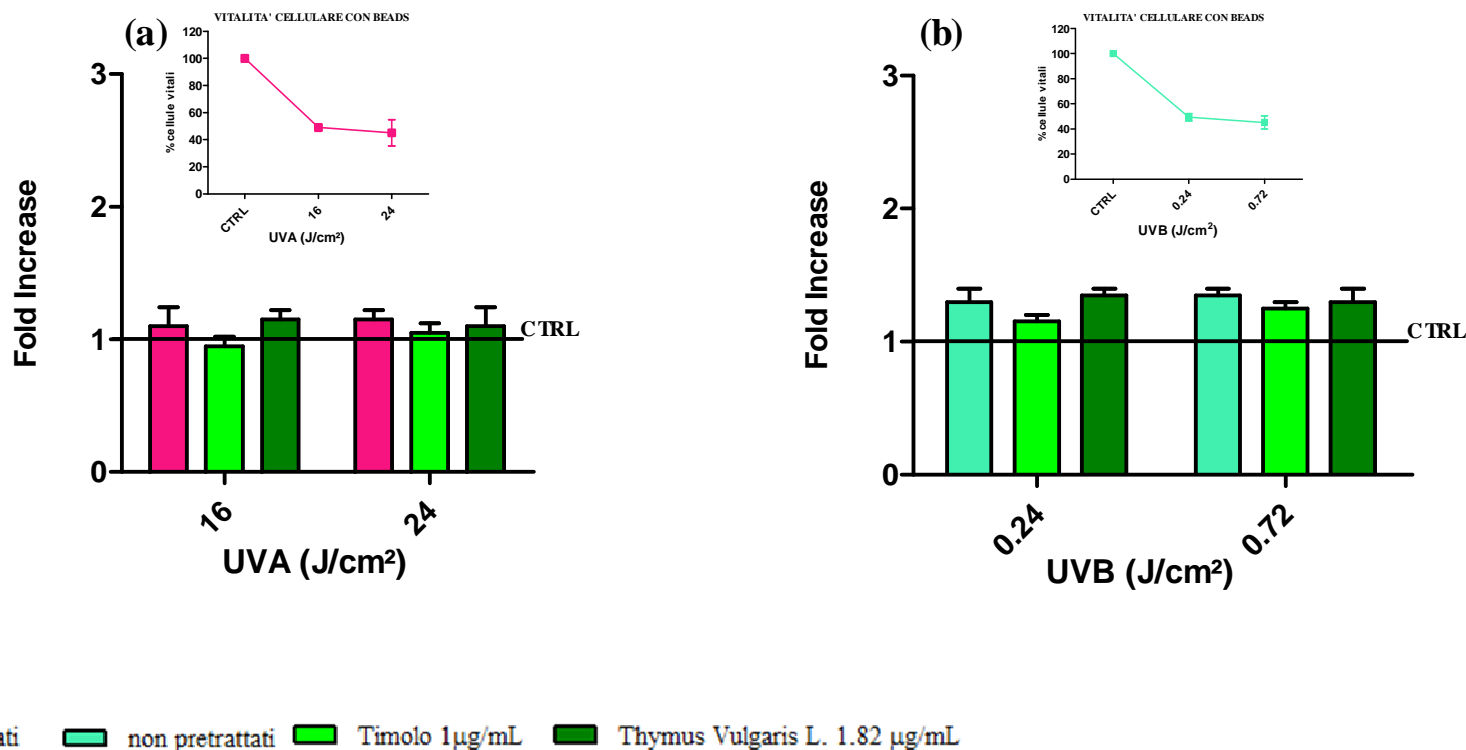
**Figura 40.** Valutazione della formazione di micronuclei in cellule NCTC 2544 pretrattate per 1 ora con *Vaccinium Myrtillus*, Timolo o estratto di *Thymus Vulgaris L.* e sottoposte ad irradiazione con UVA (a) o UVB (b). La presenza di micronuclei è stata rilevata attraverso l'utilizzo di un colorante fluorescente e i valori sono espressi come numero di volte di incremento rispetto al controllo. La valutazione della vitalità cellulare in cellule NCTC 2544 sottoposte ad irradiazione con UVA o UVB è stata effettuata mediante l'utilizzo di beads fluorescenti. I dati sono stati elaborati con test statistico One Way Anova (Dunnett's post hoc test) e Two Way Anova (Bonferroni post hoc test).

## TEST DEL MICRONUCLEO -HaCaT-



**Figura 41.** Valutazione della formazione di micronuclei in cellule HaCaT pretrattate per 1 ora con *Vaccinium Myrtillus*, Timolo o estratto di *Thymus Vulgaris L.* e sottoposte ad irradiazione con UVA (a) o UVB (b). La presenza di micronuclei è stata rilevata attraverso l'utilizzo di un colorante fluorescente e i valori sono espressi come numero di volte di incremento rispetto al controllo. La valutazione della vitalità cellulare in cellule HaCaT sottoposte ad irradiazione con UVA o UVB è stata effettuata mediante l'utilizzo di beads fluorescenti. I dati sono stati elaborati con test statistico One Way Anova (Dunnett's post hoc test) e Two Way Anova (Bonferroni post hoc test).

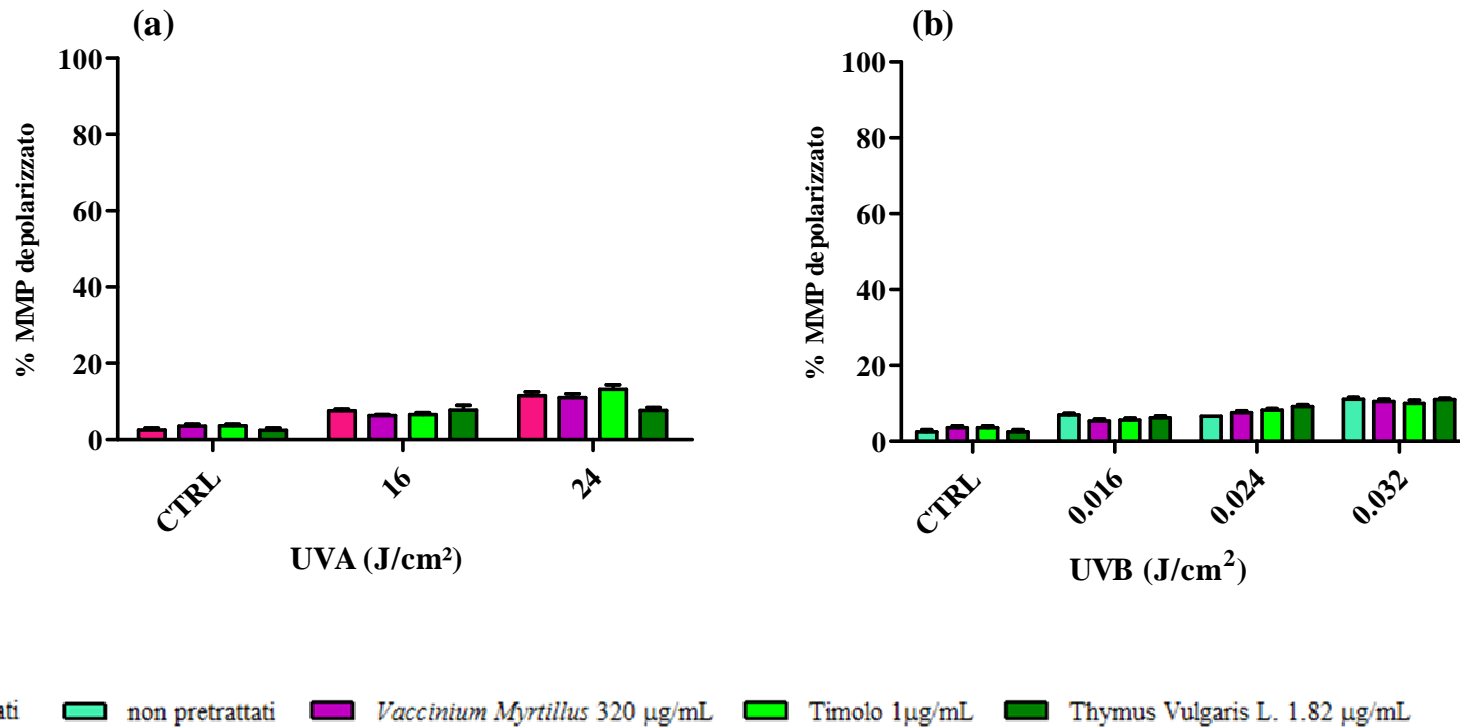
## TEST DEL MICRONUCLEO -EX VIVO-



**Figura 42.** Valutazione della formazione di micronuclei in cellule estratte dallo strato epidermico di biopsia umana pretrattate per 1 ora con Timolo o estratto di *Thymus Vulgaris L.* e sottoposte ad irradiazione con UVA (a) o UVB (b). La presenza di micronuclei è stata rilevata attraverso l'utilizzo di un colorante fluorescente e i valori sono espressi come numero di volte di incremento rispetto al controllo. La valutazione della vitalità cellulare in cellule estratte da epidermide e sottoposte ad irradiazione con UVA o UVB è stata effettuata mediante l'utilizzo di beads fluorescenti. I dati sono stati elaborati con test statistico One Way Anova (Dunnett's post hoc test) e Two Way Anova (Bonferroni post hoc test).

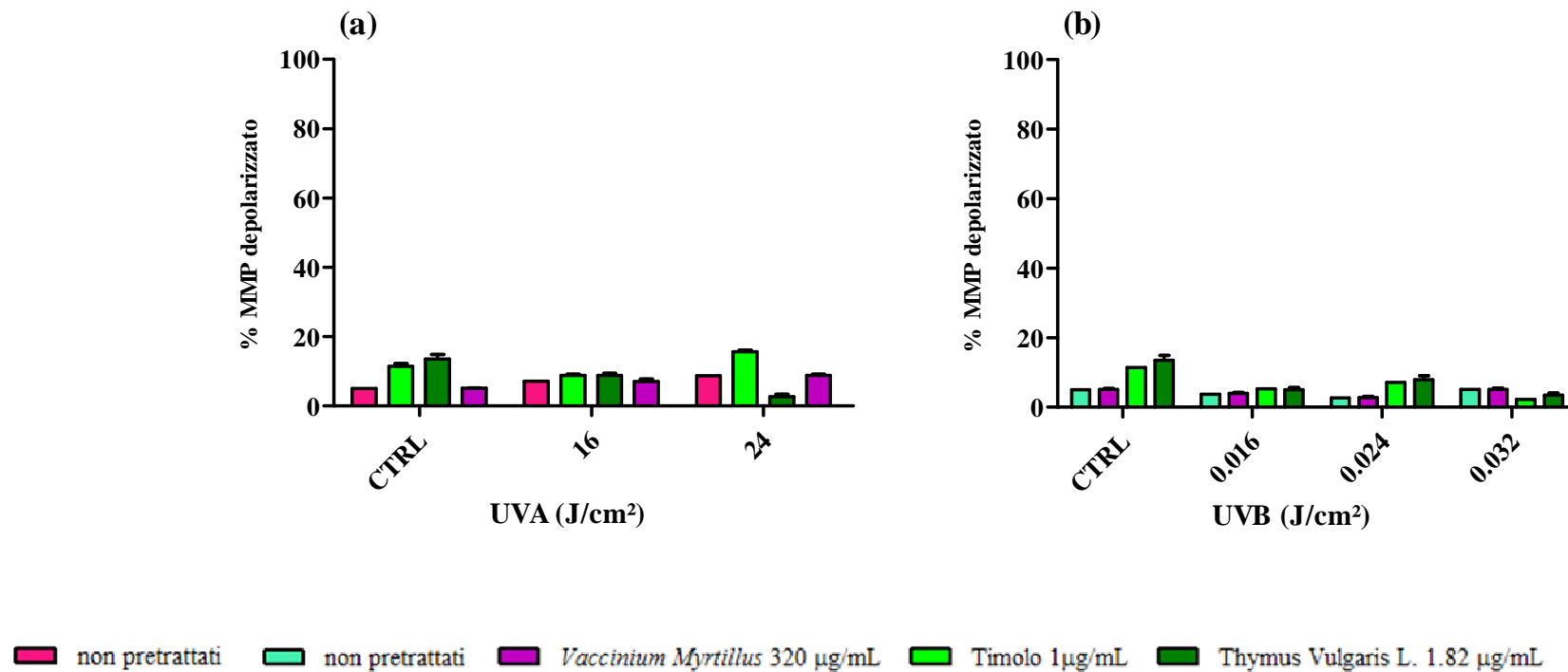


## POTENZIALE DI MEMBRANA MITOCONDRIALE -NCTC 2544-



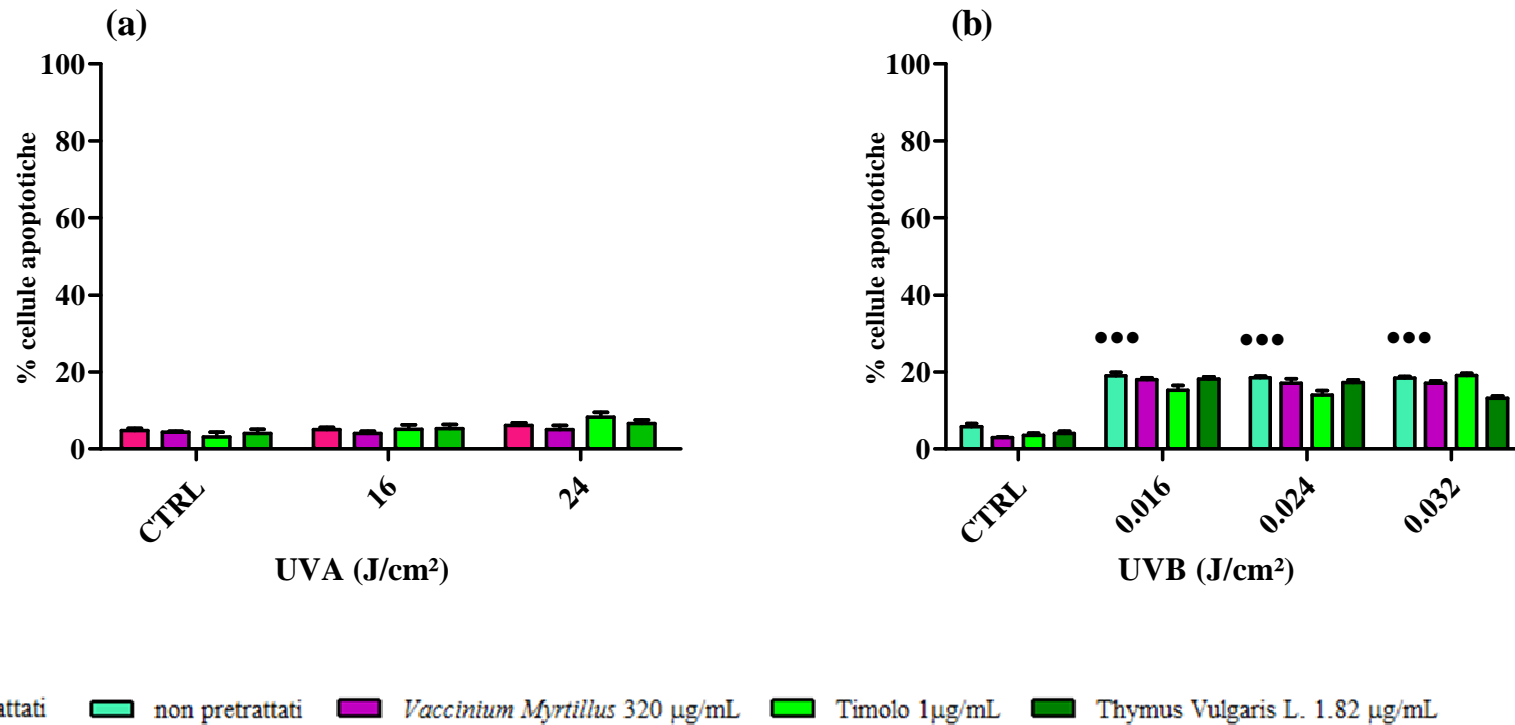
**Figura 43.** Valutazione della depolarizzazione del potenziale di membrana mitocondriale (JC-1) dopo pretrattamento delle cellule NCTC 2544 per 1 ora con *Vaccinium Myrtillus*, Timolo o *Thymus Vulgaris L.* e irradiazione con UVA (a) o UVB (b). I dati sono elaborati con One-way Anova (Dunnett's post hoc test) e Two-way Anova (Bonferroni post hoc test).

## POTENZIALE DI MEMBRANA MITOCONDRIALE -HaCaT-



**Figura 44.** Valutazione della depolarizzazione del potenziale di membrana mitocondriale (JC-1) dopo pretrattamento delle cellule HaCaT per 1 ora con *Vaccinium Myrtillus*, Timolo o *Thymus Vulgaris L.* e irradiazione con UVA (a) o UVB (b). I dati sono elaborati con One-way Anova (Dunnett's post hoc test) e Two-way Anova (Bonferroni post hoc test).

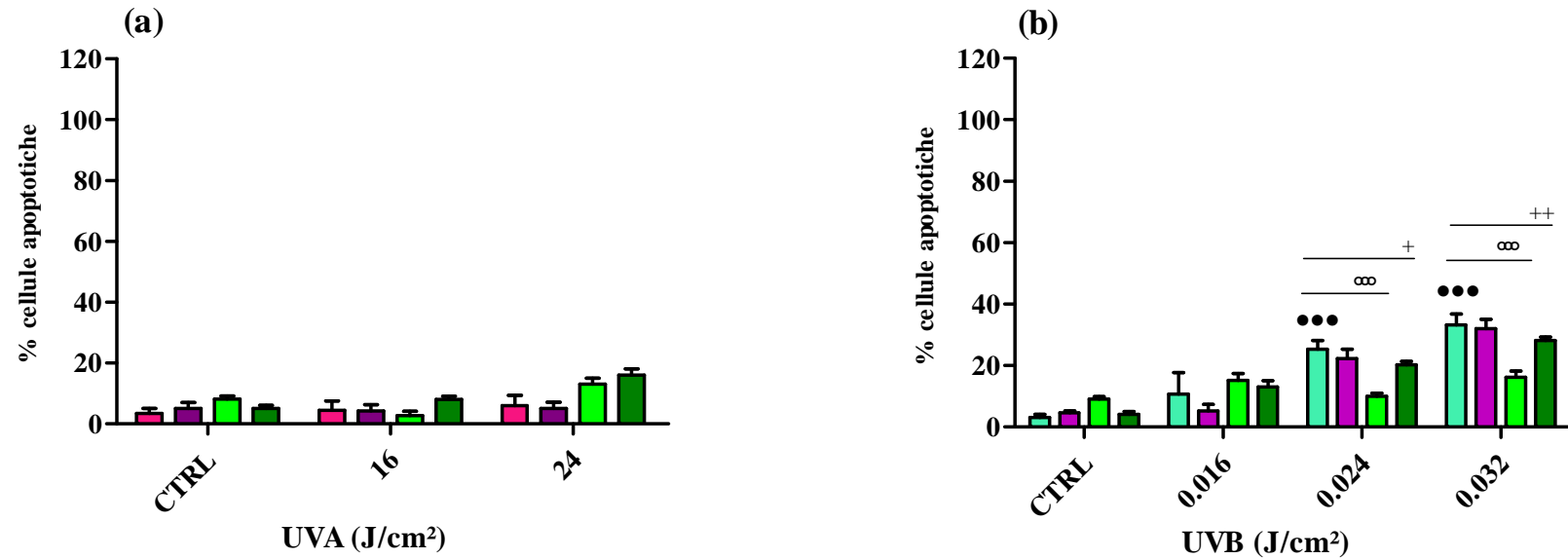
## VALUTAZIONE DELL'APOPTOSI -NCTC 2544-



\*\*\*p<0.001 One Way Anova vs CTRL

**Figura 45.** Valutazione della percentuale di cellule apoptotiche in cellule NCTC 2544 pretrattate per un'ora con *Vaccinium Myrtillus*, Timolo ed estratto di *Thymus Vulgaris L.* e successiva irradiazione con raggi UVA (a) o UVB (b). I dati sono elaborati con One-way Anova (Dunnett's post hoc test) e Two-way Anova (Bonferroni post hoc test)

## VALUTAZIONE DELL'APOPTOSI -HaCaT-



■ non pretrattati   
 ■ non pretrattati   
 ■ *Vaccinium Myrtillus* 320 µg/mL   
 ■ Timolo 1 µg/mL   
 ■ *Thymus Vulgaris L.* 1.82 µg/mL

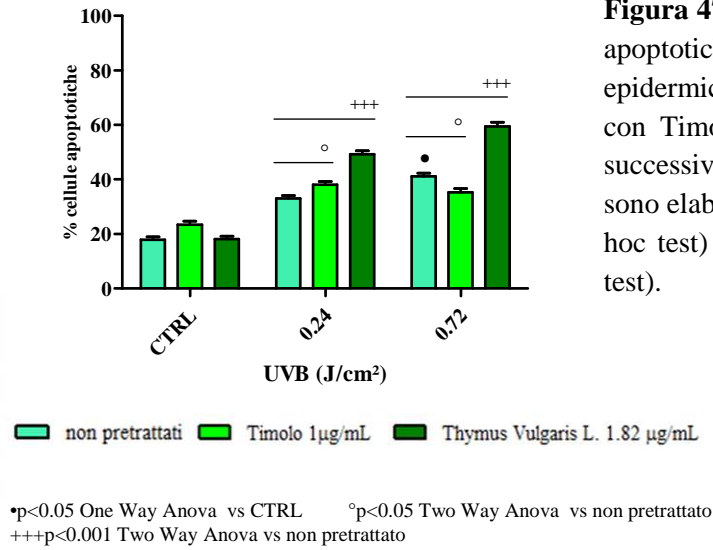
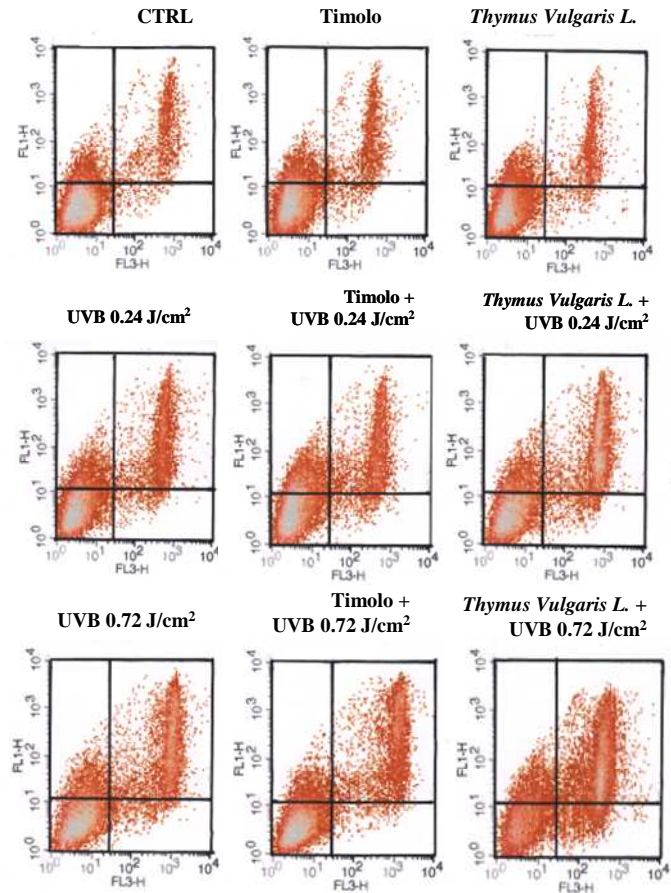
•••p<0.001 One Way Anova vs CTRL

°°°p<0.001 Two Way Anova vs non pretrattato

+p<0.05, ++p<0.01 Two Way Anova vs non pretrattato

**Figura 46.** Valutazione della percentuale di cellule apoptotiche in cellule HaCaT pretrattate per un'ora con *Vaccinium Myrtillus*, Timolo ed estratto di *Thymus Vulgaris L.* e successiva irradiazione con raggi UVA (a) o UVB (b). I dati sono elaborati con One-way Anova (Dunnett's post hoc test) e Two-way Anova (Bonferroni post hoc test).

# VALUTAZIONE DELL'APOPTOSI -EX VIVO-



**Figura 47.** Valutazione della percentuale di cellule apoptotiche in cellule estratte dallo strato epidermico di biopsia umana pretrattate per un'ora con Timolo ed estratto di *Thymus Vulgaris L.* e successivamente irradiate con raggi UVB. I dati sono elaborati con One-way Anova (Dunnett's post hoc test) e Two-way Anova (Bonferroni post hoc test).