

ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

**Dottorato di Ricerca in
Discipline delle Attività Motorie e Sportive**

XX Ciclo

Sede amministrativa: Università di Bologna

Coordinatore: Prof. Salvatore Squatrito

**AZIONE ANTIOSSIDANTE DEL SULFORAFANE:
ANALISI IN CELLULE CARDIACHE IN CULTURA
ED IN UN MODELLO ANIMALE DI ESERCIZIO
FISICO**

Tesi di Dottorato

SSD: BIO/10

Presentata da:
Dott. Marco Malaguti

Relatore:
Prof. Pierluigi Biagi

Anno dell'esame finale: 2008

Indice

INDICE	- 3 -
PRINCIPALI ABBREVIAZIONI UTILIZZATE	- 6 -
CAPITOLO 1 STRESS OSSIDATIVO ED ESERCIZIO FISICO	- 7 -
1.1 I radicali liberi	- 7 -
1.2 Le specie reattive dell'ossigeno (ROS)	- 8 -
1.2.1 Anione superossido	- 9 -
1.2.2 Perossido di idrogeno	- 9 -
1.2.3 Radicale idrossile	- 10 -
1.2.4 Ossigeno singoletto (¹ O ₂)	- 11 -
1.3 Le specie reattive dell'azoto (RNS)	- 13 -
1.4 Effetti cellulari dello stress ossidativo	- 14 -
1.4.1 Lipoperossidazione	- 14 -
1.4.2 Ossidazione del DNA	- 18 -
1.4.3 Ossidazione delle proteine	- 19 -
1.5 Concetto di ormesi	- 21 -
1.6 Esercizio fisico e produzione di ROS/RNS	- 22 -
1.6.1 Esercizio fisico aerobico e produzione di ROS/RNS	- 22 -
1.6.2 Esercizio fisico anaerobico e produzione di ROS/RNS	- 23 -
1.6.3 Esercizio fisico, stress ossidativo e fatica muscolare	- 25 -
CAPITOLO 2 STRESS OSSIDATIVO E DIFESE ANTIOSSIDANTI ENDOGENE	- 27 -
2.1 Le principali difese antiossidanti endogene	- 27 -
2.1.1 Antiossidanti primari: enzimi protettivi	- 28 -
2.1.2 Superossido dismutasi	- 28 -
2.1.3 Catalasi	- 30 -
2.1.4 Glutazione perossidasi e glutazione reduttasi	- 30 -
2.2 L'esercizio fisico stimola le difese antiossidanti endogene	- 32 -
2.3 L'esercizio modula le difese antiossidanti attivando vie di trasduzione del segnale e fattori di trascrizione	- 34 -
2.4 Esercizio fisico acuto ad esaurimento: una fonte di stress ossidativo e causa di danni muscolari	- 36 -
CAPITOLO 3 I GLUCOSINOLATI ED IL SULFORAFANE	- 39 -
3.1 Struttura chimica e proprietà	- 39 -
3.2 Fonti alimentari	- 40 -
3.2.1 Idrolisi	- 41 -

3.3	Metabolismo	- 43 -
3.3.1	Liberazione e assorbimento	- 43 -
3.3.2	Distribuzione	- 45 -
3.3.3	Metabolismo ed escrezione	- 46 -
3.4	Attività biologiche	- 48 -
3.4.1	Effetti chemiopreventivi	- 48 -
3.4.2	Modulazione degli enzimi di fase I e II	- 49 -
3.4.3	Induzione di apoptosi	- 51 -
CAPITOLO 4 INDUZIONE DEGLI ENZIMI DI FASE 2		- 53 -
4.1	Enzimi detossificanti di fase 2	- 56 -
4.1.1	Glutazione ed enzimi ad esso correlati	- 56 -
4.1.2	La tioredoxina reduttasi 1	- 59 -
4.1.3	La NADP(H): chinone ossidoreduttasi 1	- 60 -
4.1.4	Detossificazione dei chinoni attraverso la riduzione a due elettroni	- 61 -
4.1.5	NQO1 come enzima antiossidante: ruolo nel metabolismo dell'ubichinone e della vitamina E-	62 -
4.2	Induzione enzimatica ARE-mediata	- 63 -
4.2.1	Antioxidant Responsive Element (ARE)	- 64 -
4.2.2	La via mediata da keap1-Nrf2	- 66 -
4.2.3	La proteina Nrf2	- 67 -
4.2.4	Le proteine Maf	- 68 -
4.2.5	Ruolo del sulforafane nella via mediata da Keap1-Nrf2	- 68 -
4.3	Induzione degli enzimi di fase 2 mediata dal sulforafane	- 71 -
4.4	Sulforafane e stress ossidativo	- 73 -
CAPITOLO 5 SCOPO DELLA TESI		- 75 -
CAPITOLO 6 MATERIALI E METODI		- 79 -
6.1	Materiali	- 79 -
6.2	Colture cellulari di cardiomiociti neonatali, e supplementazione con sulforafane	- 80 -
6.2.1	Preparazione dei lisati cellulari	- 81 -
6.2.2	Preparazione dei lisati cellulari da sottoporre a tecniche di immunoblotting	- 82 -
6.3	Modello animale e protocollo di esercizio fisico	- 83 -
6.3.1	Preparazione degli omogenati di tessuto muscolare	- 84 -
6.4	Determinazione delle attività enzimatiche	- 85 -
6.4.1	Valutazione dell'attività dell'enzima glutazione S-transferasi	- 85 -
6.4.2	Valutazione dell'attività dell'enzima glutazione reduttasi	- 86 -
6.4.3	Valutazione dell'attività dell'enzima glutazione perossidasi	- 87 -
6.4.4	Valutazione dell'attività dell'enzima superossido dismutasi	- 88 -
6.4.5	Valutazione dell'attività dell'enzima catalasi	- 90 -
6.4.6	Valutazione dell'attività dell'enzima NADPH-chinone reduttasi	- 91 -
6.4.7	Valutazione dell'attività dell'enzima tioredoxina reduttasi	- 92 -
6.4.8	Valutazione dell'attività dell'enzima lattico deidrogenasi nel plasma	- 93 -
6.5	Estrazione di RNA e RT-PCR	- 94 -
6.6	Immunoblotting	- 95 -

6.7	Valutazione dei livelli intracellulari di glutazione ridotto	- 96 -
6.8	Valutazione della formazione intracellulare di specie reattive dell'ossigeno	- 97 -
6.9	Analisi della vitalità cellulare	- 98 -
	CAPITOLO 7 RISULTATI	- 101 -
7.1	Effetto del sulforafane sull'espressione ed attività degli enzimi detossificanti di fase 2 in cardiomiociti in coltura	- 101 -
7.1.1	Glutazione S-Transferasi	- 101 -
7.1.2	Glutazione Reduttasi	- 103 -
7.1.3	Glutazione perossidasi	- 105 -
7.1.4	NAD(P)H: chinone ossidoreduttasi 1	- 107 -
7.1.5	Tioredoxina reduttasi	- 109 -
7.1.6	Attività della superossido dismutasi	- 111 -
7.1.7	Attività della catalasi	- 112 -
7.1.8	Contenuto intracellulare di Glutazione ridotto (GSH)	- 113 -
7.1.9	Produzione di ROS	- 114 -
7.1.10	Vitalità cellulare	- 115 -
7.2	Effetto del sulforafane sulle attività degli enzimi detossificanti/antiossidanti nel tessuto muscolare di ratti sottoposti ad esercizio fisico acuto ad esaurimento.	- 116 -
7.2.1	Glutazione S-Transferasi	- 117 -
7.2.2	Glutazione reduttasi	- 118 -
7.2.3	Glutazione perossidasi	- 119 -
7.2.4	NADPH chinone ossidoreduttasi 1	- 120 -
7.2.5	Tioredoxina reduttasi	- 121 -
7.2.6	Superossido dismutasi	- 122 -
7.2.7	Catalasi	- 123 -
7.2.8	Lattico deidrogenasi	- 124 -
	CAPITOLO 8 DISCUSSIONE	- 125 -
8.1	Effetto di SF sugli enzimi detossificanti/antiossidanti e sua protezione nei confronti del danno indotto da stress ossidativo nella cellula cardiaca	- 125 -
8.2	Effetto protettivo di SF nei confronti dello stress ossidativo indotto da esercizio fisico ad acuto esaurimento	- 130 -
8.3	Conclusioni	- 135 -
	BIBLIOGRAFIA	- 137 -
	ALLEGATO A:PUBBLICAZIONI A STAMPA	- 151 -
	ALLEGATO B: COMUNICAZIONI A CONGRESSI	- 152 -

Principali abbreviazioni utilizzate

AMP/ADP/ATP	Adenosin-mono-di-tri-fosfato
AhR	Recettore arilidrocarburo
AP1	Fattore di trascrizione AP1
ARE	Antioxidant responsive element
BaP	Benzo[a]pirene
BHA	Butilidrossianisolo
CAT	Catalasi
CK	Creatina Chinasi
CYP	Citocromo P450
GLS	Glucosinolati
GPx	Glutazione perossidasi
GR	Glutazione reduttasi
GSH/GSSG	Glutazione
GST	Glutazione-S-transferasi
HDAC	Istoni deacetilati
HO-1	Emeossigenasi 1
IL-1	Interleuchina 1
IL-6	Interleuchina 6
IL-8	Interleuchina 8
ITC	Isotiocianati
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
NAD⁺/NADH	Nicotinammideadeninucleotide
NADP⁺/NADPH	Nicotinammideadeninucleotidefosfato
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
NQO1	NAD(P)H chinone ossido reduttasi
Nrf2	Nuclear respiratory factor 2
PI3K	Fosfatidilinositolo-3-chinasi
PMN	Leucociti polimorfonucleati
ROS	Specie Reattive dell'Ossigeno
RNS	Specie Reattive dell'Azoto
SF	Sulforafane
SOD	Superossido Dismutasi
TBARS	Sostanze reattive all'acido tiobarbiturico
tBHQ	ter-butilidrochinone
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin
TNF-α	Fattore di necrosi tumorale α
TP	Tioredoxina perossidasi
TR	Tioredoxina reduttasi
TRx	Tioredoxina
VEGF	Fattore di crescita vascolare endoteliale
XO	Xantina Ossidasi
XRE	Enobiotic responsive element
γGCS	γ -glutamilmisteina sintetasi

Capitolo 1 Stress ossidativo ed esercizio fisico

1.1 I radicali liberi

Per radicale libero si intende una specie chimica, capace di esistenza indipendente, contenente un elettrone spaiato nell'orbitale più esterno. Tali molecole sono instabili ed altamente reattive in quanto tendono a sottrarre ad altre molecole un elettrone per raggiungere una maggior stabilità.

Se due radicali reagiscono tra loro, vengono entrambi eliminati; se un radicale reagisce con un non radicale, verrà prodotto un altro radicale libero. Questo meccanismo fa sì che i radicali liberi determinino delle reazioni a catena.

I radicali liberi sono generati endogenamente durante i normali processi fisiologici. Questi includono la respirazione mitocondriale e le reazioni che coinvolgono enzimi, come la lipossigenasi e la xantina ossidasi (XO), o la generazione di pro-ossidanti da parte delle cellule fagocitarie del sistema immunitario (*Valko et al. 2007*).

Le cellule, per generare energia, ossidano enzimaticamente sostanze alimentari e riducono l'ossigeno ad acqua; per effettuare questa trasformazione l'ossigeno molecolare necessita di quattro elettroni. Questa cessione di elettroni all'ossigeno non avviene contemporaneamente, ma uno per volta, con generazione di specie intermedie altamente instabili e reattive indicate spesso in letteratura come "specie reattive dell'ossigeno" o ROS (reactive oxygen species). Se la cessione di elettroni all'ossigeno non si completa, questi ROS verranno rilasciati all'interno dei mitocondri.

Le cellule hanno sviluppato una serie di meccanismi per intercettare e neutralizzare queste specie reattive dell'ossigeno ma non sempre tali difese risultano efficaci. Si parla quindi di "paradosso dell'ossigeno", elemento necessario per la sopravvivenza ma, al tempo stesso, causa di molteplici danni.

1.2 Le specie reattive dell'ossigeno (ROS)

L'ossigeno, quando ossida le altre sostanze, viene esso stesso sottoposto ad una serie di riduzioni in cui sottrae elettroni da altre molecole e produce una serie di intermedi radicalici. La formazione di questi composti altamente reattivi è dovuta all'impossibilità, da parte dell'ossigeno, di acquisire contemporaneamente i quattro elettroni necessari per la riduzione ad acqua.

La maggior parte delle molecole contiene coppie di elettroni con spin opposto che si trovano in orbitali molecolari discreti e che potrebbero, o meno, partecipare alla formazione di legami. L'ossigeno contiene due elettroni con spin parallelo che risiedono ognuno in un proprio orbitale.

Termodinamicamente, l'ossigeno ha la tendenza ad acquisire elettroni (due per atomo o quattro per molecola) per produrre molecole d'acqua che hanno una minor energia. La particolare distribuzione degli elettroni nella molecola di ossigeno, tuttavia, impedisce all'ossigeno di accettare una coppia di elettroni con spin opposto fino a che uno dei suoi due elettroni spaiati non subisce un'inversione di spin spontanea. Alle ordinarie frequenze di collisione il periodo di contatto è troppo breve perché avvenga questo cambiamento di spin, imponendo una barriera cinetica (cioè una grande energia di attivazione) alla maggior parte delle reazioni ossidative. È proprio questa barriera che rende l'ossigeno un ideale accettore terminale di elettroni nei sistemi biologici. Gli enzimi hanno siti di legame che possono mantenere l'ossigeno in contatto con un substrato ossidabile per un tempo molto più lungo di quello che si avrebbe per semplice collisione, superando la barriera cinetica della reazione (*McCord 2000*).

Quasi il 98% dell'ossigeno è metabolizzato da un singolo enzima, la citocromo ossidasi dei mitocondri, che trasferisce quattro elettroni all'ossigeno in una reazione concertata per produrre due molecole d'acqua come prodotto. L'enzima è abbastanza complesso da un punto di vista strutturale, contiene quattro centri redox (due gruppi eme e due ioni rame), ognuno dei quali può acquistare un singolo elettrone. Quando tutti i centri sono ridotti, si ha il trasferimento dei quattro elettroni ad una molecola di ossigeno.

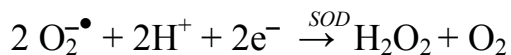
1.2.1 Anione superossido

Il primo passo, nella generazione dei ROS, è rappresentato dall'acquisizione da parte dell'ossigeno di energia sufficiente per raggiungere lo stato di singoletto e dalla successiva acquisizione di un elettrone da altre specie.

Si forma così il radicale anione superossido $O_2^{\bullet-}$, forte ossidante ed agente citotossico (*Mitscher et al. 1997*). Questa specie, altamente reattiva, è capace di attaccare un ampio numero di substrati per completare i propri orbitali. In particolare, il radicale superossido si può formare:

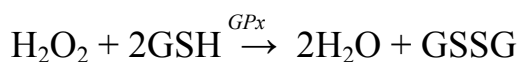
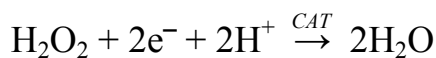
- Per interazione dell' O_2 con gli elettroni che talora sfuggono alla catena respiratoria quando questa funziona a regimi elevati, soprattutto nel passaggio ossido-riduttivo tra coenzima Q e citocromi.
- Nel corso di ossidazioni metallo-dipendenti di molecole tipo adrenalina, noradrenalina o anche alcuni composti tiolici.
- Per produzione diretta in alcune reazioni enzimatiche specifiche quali quelle catalizzate dalle xantine ossidasi, triptofano diossigenasi e indolamine diossigenasi.

Il danno che può causare è però minimizzato dalla compartimentalizzazione biologica, dall'attività di enzimi protettivi e dalla presenza di specie in grado di intercettarlo. Il superossido non può infatti attraversare le membrane cellulari; viene parzialmente detossificato dall'azione riduttiva della superossido dismutasi (SOD) che lo converte a perossido di idrogeno addizionandogli un protone ed un elettrone.



1.2.2 Perossido di idrogeno

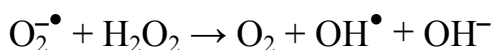
Nella reazione di dismutazione del superossido si forma perossido di idrogeno che, in condizioni normali, non è tossico essendo rapidamente neutralizzato dall'azione della catalasi (CAT) e della glutatione perossidasi (GSH-prx) secondo le reazioni:



Il perossido di idrogeno si può formare anche per produzione diretta in alcune reazioni enzimatiche a livello dei microsomi, perossisomi e mitocondri. All'interno della cellula è presente in concentrazioni variabili fra 10^{-9} e 10^{-7} M. Il rischio associato all'idroperossido sta nella sua capacità di attraversare le membrane cellulari e di diffondere in altri distretti cellulari e tissutali dove può attivare processi degenerativi di perossidazione.

1.2.3 Radicale idrossile

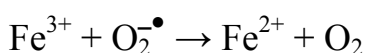
Nel processo di Haber-Weiss, una molecola di superossido ed una molecola di perossido di idrogeno si combinano per formare una molecola di ossigeno, un equivalente di radicale idrossile ed uno di anione ossidrile. Questo processo è catalizzato dagli ioni Fe^{2+} o Cu^+ .



Nella reazione di Fenton, una molecola di perossido di idrogeno è convertita in un radicale idrossile ed in un anione ossidrile con contemporanea ossidazione di Fe^{2+} a Fe^{3+} .



Il Fe^{3+} così formatosi può, a sua volta, reagire con un radicale superossido secondo la reazione seguente, rigenerando Fe^{2+} che può nuovamente reagire con H_2O_2 nella reazione di Fenton.



Va precisato che il ferro, contenuto nelle cellule e nel plasma, è solitamente legato a proteine di trasporto, di deposito e funzionali e, in questa forma, non è mai reattivo. La reazione di Fenton può quindi avvenire solo in presenza di ferro libero. Il ferro si può liberare dalle proteine chelanti in seguito alla diminuzione del pH, dovuta, per esempio, all'accumulo di acido lattico in seguito ad ischemie, emorragie, traumi e per interazione di $\text{O}_2^{\bullet-}$ con la ferritina.

Il radicale idrossile OH^{\bullet} , originato dalle precedenti reazioni, è, tra i radicali dell'ossigeno, la molecola più tossica e costituisce l'agente responsabile della fase iniziale dei processi perossidativi nei nostri tessuti. OH^{\bullet} è in grado di collidere e danneggiare tutte le macromolecole cellulari:

proteine, acidi nucleici, glicosaminoglicani e soprattutto gli acidi grassi polinsaturi dei fosfolipidi di membrana.

1.2.4 Ossigeno singoletto (1O_2)

L'ossigeno singoletto è una forma altamente reattiva di ossigeno molecolare che può nuocere ai sistemi viventi ossidando molecole organiche critiche. 1O_2 è un derivato della molecola di ossigeno in cui tutti gli elettroni di valenza hanno spin opposti; differisce dallo stato fondamentale (tripletto) dell'ossigeno molecolare nell'inversione della direzione dello spin di un elettrone nell'orbitale di valenza più esterno.

La configurazione elettronica dell'ossigeno singoletto 1O_2 è semplificata come $(\pi^*2p_x)^2, (\pi^*2p_y)^0$, evidenziando la sua natura non radicalica. In contrasto lo stato fondamentale di ossigeno tripletto 3O_2 è quello di un diradicale $(\pi^*2p_x)^1, (\pi^*2p_y)^1$, in modo tale che i due elettroni di valenza più esterni occupano orbitali separati con spin paralleli (figura 1.1).

σ^*2p					
π^*2p					
$\pi 2p$					
$\sigma 2p$					
σ^*2s					
$\sigma 2s$					
σ^*1s					
$\sigma 1s$					
NOME:	FORMA STABILE DELL' O_2	O_2 SINGOLETTO	SUPEROSSIDO	IONE PEROSSIDO	O_2 SINGOLETTO
SIMBOLO CHIMICO:	O_2	1O_2 ($^1\Delta_g^+$)	O_2^-	O_2^{2-}	1O_2 ($^1\Sigma_g^+$)
RADICALE:	SI	NO	SI	NO	SI
OSSIDANTE:	NO	SI	SI	NO	SI

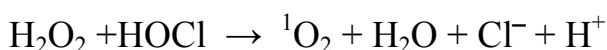
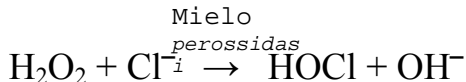
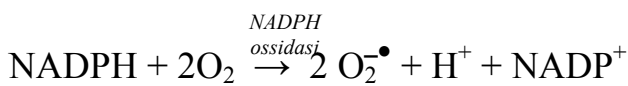
Figura 1.1: struttura dell'ossigeno singoletto.

L'ossigeno molecolare tripletto è soggetto ad una limitazione di spin nei confronti delle reazioni con la maggior parte delle molecole organiche. In 1O_2 tale limitazione di spin è rimossa, permettendo a questa specie di reagire come ossidante elettrofilo.

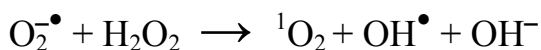
Da studi in vitro è emerso che $^1\text{O}_2$ ossida molte molecole organiche inclusi lipidi di membrana, proteine, aminoacidi, acidi nucleici, nucleotidi, nucleotidi piridinici, carboidrati e tioli. Sono stati individuati quattro principali meccanismi di reazione:

- 1 Reazioni di addizione con il doppio legame carbonio-carbonio nelle olefine insature (reazione di Alder “ene”) per formare idroperossido.
- 2 Reazioni di addizione con sistemi di dieni coniugati (reazione di Diels-Alder) per formare endoperossidi ciclici.
- 3 Reazioni con composti fenolici per formare idroperossidienoni.
- 4 Reazioni di trasferimento di energia che trasformano $^1\text{O}_2$ in $^3\text{O}_2$ con composti come i carotenoidi, bilirubina, tocoferolo, fenoli, complessi del nichel e ioni.

$^1\text{O}_2$ si può formare tramite esposizione a luce ultravioletta (320-380 nm) o durante l’attivazione dei macrofagi. L’azione della NADPH ossidasi produce il radicale anione superossido che, spontaneamente o enzimaticamente, dismuta per formare perossido di idrogeno. La mieloperossidasi dei macrofagi o attività perossidasiche correlate, catalizzano la riduzione del perossido di idrogeno per formare l’ossidante acido ipocloroso. L’acido ipocloroso e H_2O_2 reagiscono per formare ossigeno singoletto.

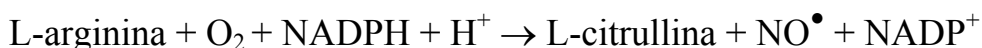


È stato ipotizzato che ossigeno singoletto si formi anche come prodotto collaterale della perossidazione lipidica e recenti studi hanno dimostrato che $^1\text{O}_2$ può formarsi anche come prodotto primario di una reazione in vitro di Haber-Weiss (*Khan et al 1994*).



1.3 Le specie reattive dell'azoto (RNS)

L'ossido nitrico (NO^\bullet) rappresenta un ulteriore membro della famiglia dei radicali liberi affine sotto alcuni aspetti al radicale superossido, ad esempio per la sua velocità di reazione. Questo radicale libero gassoso viene prodotto a partire dalla L-arginina in una reazione catalizzata dalla ossido nitrico sintasi (NOS):



Si conoscono tre isoforme dell'enzima: nNOS, enzima costitutivo del tessuto neuronale; iNOS, enzima inducibile dalle citochine nei macrofagi attivati e nel fegato ed eNOS, costitutivo delle cellule dell'endotelio vascolare.

Alle concentrazioni fisiologiche NO^\bullet svolge la funzione di messaggero intracellulare stimolando la guanilato-ciclastasi e le proteine chinasi, in più possiede la capacità di attraversare le membrane cellulari e di trasmettere così i segnali anche alle cellule adiacenti (*Ignaro et al. 1990*). Se a livello cellulare risultano elevati i livelli di superossido e di H_2O_2 , l'ossido nitrico può reagire con queste due molecole portando alla formazione di perossinitrito (OONO^-) che è un composto ad elevata citotossicità, il cui potere ossidante è maggiore di quello di O_2^\bullet e di H_2O_2 (*McCord 2000*).

Il perossinitrito ha la capacità di reagire con diverse molecole, come ad esempio la CO_2 dando un composto ad elevata reattività noto come nitroso perossicarbossilato (ONOOCO_2), oppure protonarsi ad acido perossinitroso (ONOOH), o ancora subire l'omolisi a OH^\bullet e NO_2^\bullet o il riarrangiamento a nitrato (NO_3).

L'instaurarsi o meno di una di queste differenti reazioni del perossinitrito dipende da vari fattori fra cui la temperatura, il pH e dai differenti composti presenti nell'ambiente di reazione.

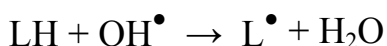
1.4 Effetti cellulari dello stress ossidativo

La caratteristica peculiare dei radicali liberi di determinare delle reazioni a catena riveste un ruolo sfavorevole in molti meccanismi biologici, in quanto ROS e radicali liberi prendono parte a molti processi degenerativi. Possono, infatti, danneggiare strutture quali lipidi, proteine, DNA, e sono fortemente implicati nello sviluppo di alcune malattie quali aterosclerosi (*Stringer et al. 1989*), artrite reumatoide (*Lunecet al. 1981*) e alcune forme di cancro (*Ishii et al. 2007*). Va inoltre precisato che, se il collegamento tra queste patologie e radicali liberi è ampiamente accettato, i dettagli di queste interazioni non sono ancora ben conosciuti (*Mitscher et al. 1997*). I radicali liberi possono teoricamente interagire con qualsiasi molecola dell'organismo, radicalizzandola; ovviamente il tipo di molecola colpita determinerà il tipo di danno conseguente.

1.4.1 Lipoperossidazione

La perossidazione dei lipidi si ha a livello degli acidi grassi polinsaturi, contenuti in elevate concentrazioni soprattutto nei fosfolipidi delle membrane cellulari.

Si parla di lipoperossidazione quando l'azione ossidativa a carico dei lipidi procede con meccanismo radicalico a catena. Il processo è iniziato dal radicale idrossile quando questa specie cattura un atomo di idrogeno da un carbonio metilenico nella catena polialchilica dell'acido grasso:



Il radicale formatosi (L^\bullet) tende a stabilizzare la sua struttura attraverso un riarrangiamento a diene coniugato (figura 1.2). I dieni coniugati rappresentano quindi un indice primario di perossidazione lipidica essendo i primi prodotti di questo processo ossidativo.

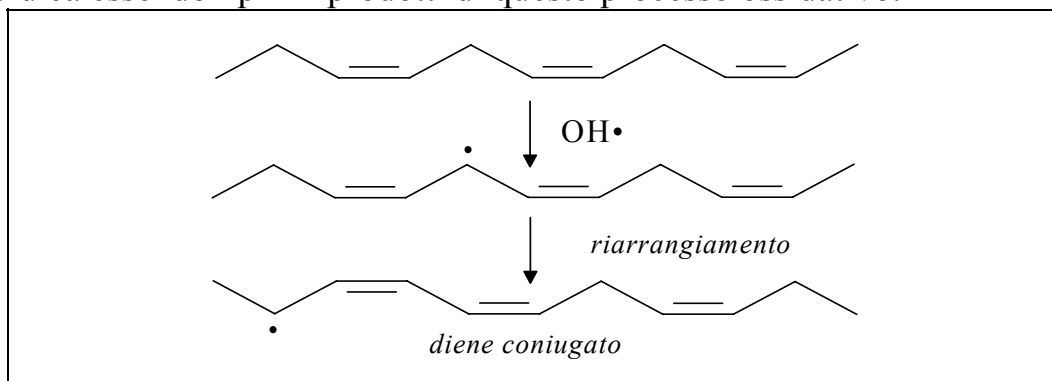


Figura 1.2: formazione di dieni coniugati nel processo di perossidazione.

In condizioni aerobiche un acido grasso con un elettrone spaiato subisce un riarrangiamento molecolare con O_2 (figura 1.3) per generare un radicale perossilipidico (LOO^\bullet).

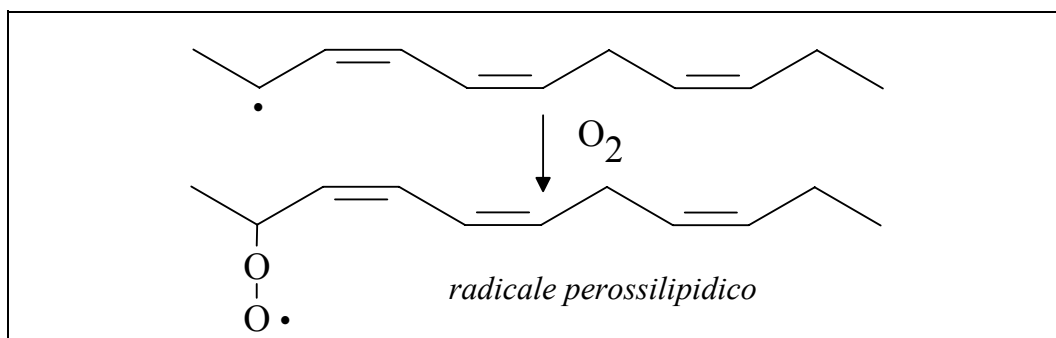


Figura 1.3: formazione del radicale perossilipidico.

Questo prodotto è altamente reattivo e può dar luogo a due diverse reazioni (Gate et al. 1999):

1. Si può avere la ciclizzazione del gruppo perossilico con formazione di un lipoperossido ciclico, a partire da acidi grassi quali l'acido arachidonico e eicosapentaenoico (figura 1.4). Questo prodotto può a sua volta, per reazioni successive, frammentarsi e dar luogo a catene alifatiche contenenti due gruppi funzionali carbonilici generando la malondialdeide (MDA), una dialdeide altamente reattiva (Draper et al. 1990). La MDA può reagire con i gruppi aminici liberi di proteine, fosfolipidi o acidi nucleici per produrre modificazioni strutturali delle molecole biologiche. Queste nuove strutture indotte dalla MDA vengono successivamente riconosciute dal sistema immunitario come estranee portando ad una risposta autoimmune. Si possono, per esempio, formare legami covalenti stabili tipo basi Schiff (figura 1.5). La formazione di questi legami può portare ad un danneggiamento delle funzionalità di membrana, in quanto la formazione di legami crociati proteina-MDA-fosfolipide o proteina-MDA-proteina o fosfolipidi-MDA-fosfolipide porta ad un irrigidimento e perdita di fluidità della membrana stessa. Va inoltre considerato che la formazione del singolo legame MDA-proteina può alterare la funzionalità biologica della proteina stessa, mentre il legame MDA-fosfolipide può alterare il rapporto tra la regione idrofilica ed idrofobica dei fosfolipidi, andando a compromettere l'efficienza funzionale delle membrane biologiche.

2. I radicali possono anche catturare molecole di idrogeno dagli acidi grassi adiacenti per formare un lipide idroperossido, inducendo la propagazione della perossidazione lipidica. L^\bullet può propagare ulteriormente le reazioni di perossidazione; in altre parole, dopo la fase di iniziazione dei processi di perossidazione promossa dai radicali dell'ossigeno, ha inizio la fase di propagazione dei processi di perossidazione.

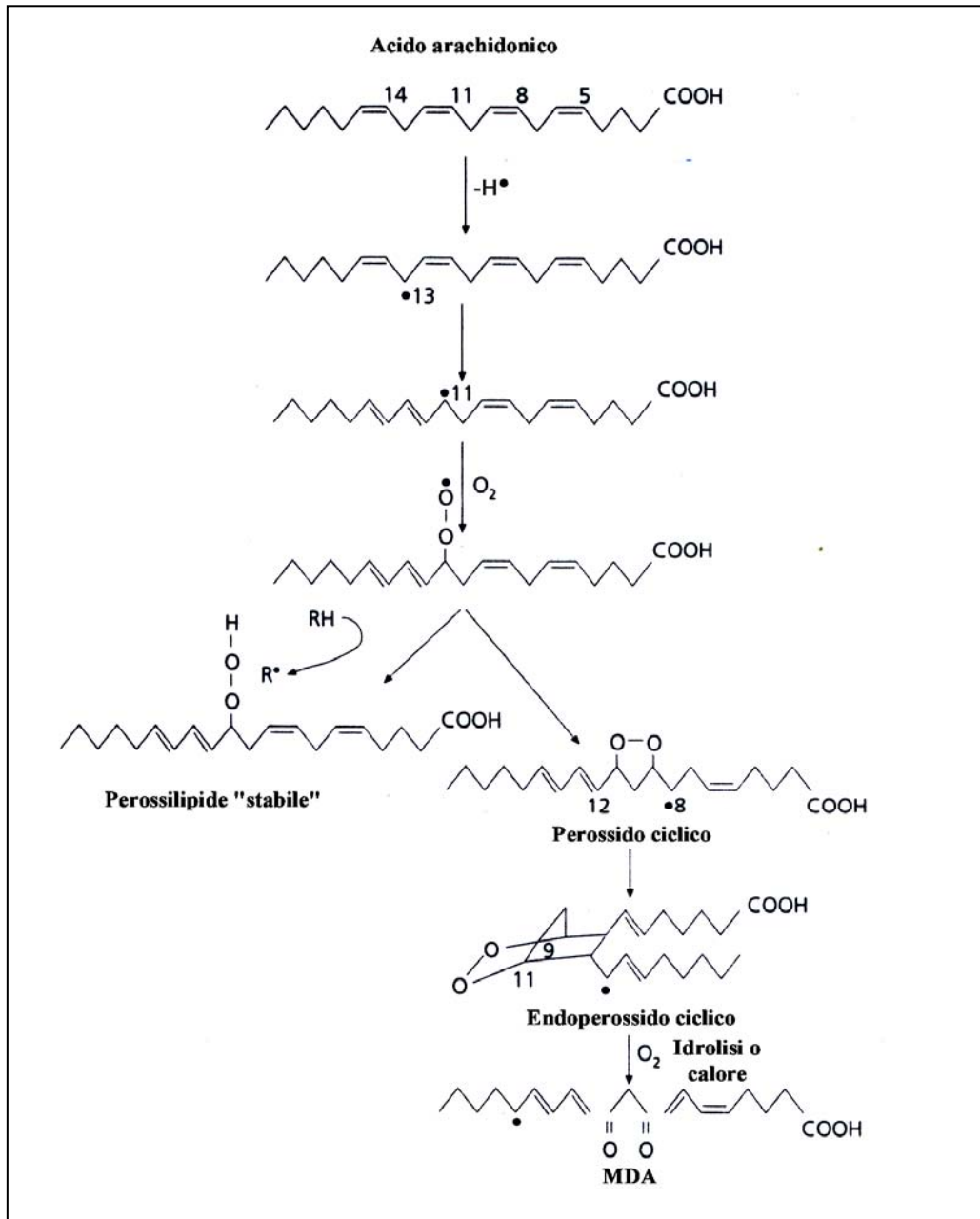
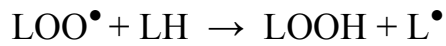


Figura 1.4: formazione di idroperossidi e perossidi ciclici dall'acido arachidonic.

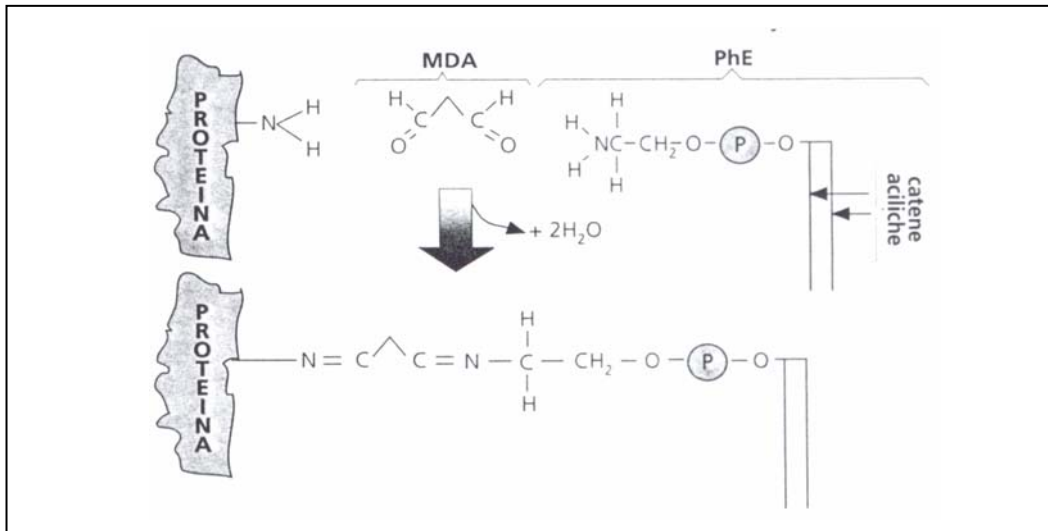


Figura 1.5: formazione dei legami tipo "basi di Schiff" tra la malonaldeide e i gruppi amminici di proteine e fosfolipidi.

La frammentazione e le lesioni molecolari degli acidi grassi insaturi dei fosfolipidi portano alla perdita della struttura della membrana cellulare, alla diminuzione della sua fluidità, alla perdita delle normali interazioni lipidi-lipidi e lipidi-proteine ed alla formazione di regioni idrofile nel core lipidico idrofobo. In seguito ad un processo perossidativo a carico di un fosfolipide contenente un acido grasso polinsaturo, l'attacco del radicale R^\bullet in presenza di O_2 trasforma l'acido grasso polinsaturo del fosfolipide in perossilipide: il gruppo perossilico così formato è molto più idrofilico di quello originario e tende a portarsi nella regione superficiale del bilayer ripiegando ad U la catena acilica dell'acido grasso (figura 1.6). Questa nuova configurazione determina un aumento dell'ingombro, con conseguenti alterazioni strutturali e funzionali della membrana. La nuova configurazione del legame estereo, tra il glicerolo del fosfolipide ed il carbossile del perossilipide, facilita inoltre l'attività della fosfolipasi A_2 di membrana, che idrolizza il fosfolipide perossidato a lipofosfolipide ed acido perossilipidico libero, comportando un ulteriore danno alla struttura e alla funzionalità della membrana.

Si possono inoltre avere fenomeni di alchilazione di gruppi funzionali critici di proteine (gruppi SH) da parte di prodotti aldeidici derivanti dalla perossidazione con rottura dei legami peptidici o formazione di ponti disolfuro (-S-S-) intramolecolari. In tal modo si possono inattivare (o più raramente attivare) enzimi, alterare i sistemi recettoriali, e/o compromettere l'azione di proteine essenziali per l'omeostasi cellulare.

Importante è l'alterazione delle proteine del citoscheletro (actina e tubulina) e delle proteine di regolazione dei canali del calcio.

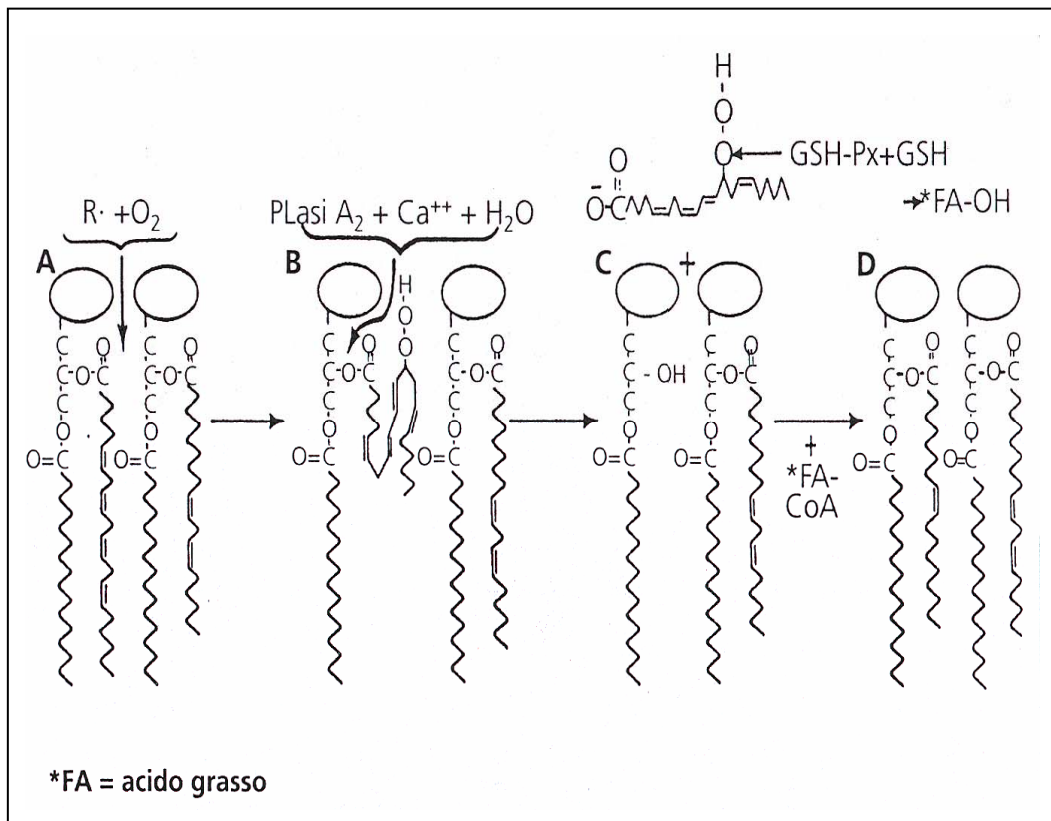


Figura 1.6: modello di danno perossidativo a carico di un fosfolipide polinsaturo di membrana.

1.4.2 Ossidazione del DNA

Tra i vari tipi di danni cellulari che possono essere causati dalle specie reattive dell'ossigeno, quello al DNA è potenzialmente il più pericoloso in quanto queste molecole hanno la capacità di autoreplicarsi preservando e moltiplicando le conseguenze del danno cellulare.

Le più comuni alterazioni ossidative delle basi del DNA riguardano l'inserimento dell'ossigeno nel doppio legame ed il distacco delle basi dagli zuccheri. Se queste basi danneggiate vengono rimosse e riparate prima della divisione cellulare non ci sarà nessun danno permanente. Se invece il meccanismo di riparazione fallisce, la successiva generazione riceverà una molecola di DNA difettosa in cui una base normale (G, C, A o T) è cancellata, o incorrettamente sostituita da una base difettosa (*Mitschet et al. 1997*).

Esempi di danno agli acidi nucleici sono: scambio di frammenti cromatidici, formazione di legami intermolecolari tra molecole di DNA o tra DNA e proteine e modificazioni ossidative delle basi. Le più sensibili sono le basi pirimidiniche citosina e timina, che possono subire la saturazione, l'apertura o l'idrossilazione dell'anello eterociclico. Ciò comporta la perdita dell'aromaticità e della planarità, causando distorsioni nella struttura del DNA. L'ossidazione della timina può portare alla formazione di dimeri (figura 1.7).

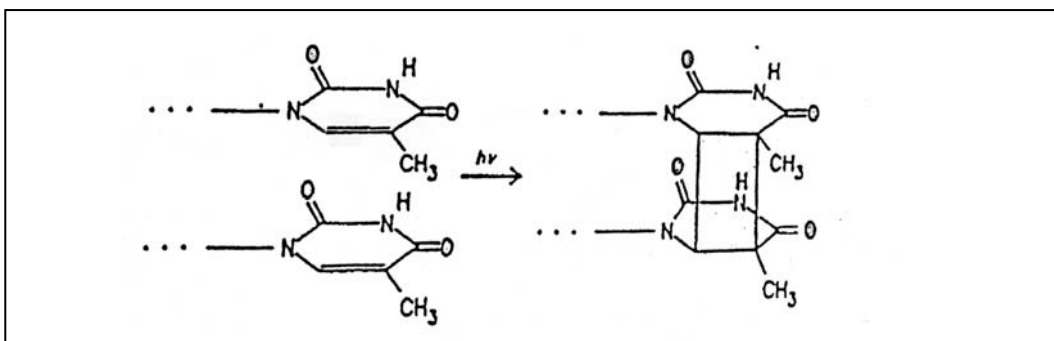


Figura 1.7: dimerizzazione dei residui di timina.

Le alterazioni al DNA conducono quindi a mutagenesi (*Ames et al. 1983*) e carcinogenesi (*Floyd et al. 1990*). È stato suggerito che l'alterazione del DNA sia, in parte, responsabile del processo di invecchiamento (*Fraga et al. 1990*, del diabete mellito (*Dandona et al. 1996*) delle malattie infiammatorie (*Ames et al. 1983*) e delle patologie epatiche (*Sipowicz et al. 1997*).

1.4.3 Ossidazione delle proteine

Anche le proteine sono un bersaglio per i radicali liberi, in particolare quelle dotate di gruppi -SH di superficie sono più esposte alla collisione radicalica. Tra le proteine enzimatiche, che per prime risentono dell'attacco dei radicali liberi e che quindi si denaturano, sono da ricordare la fosfofruttochinasi I (enzima chiave della via glicolitica) e il complesso I della catena respiratoria. L'inattivazione di questi due enzimi porta ad una riduzione del metabolismo energetico cellulare.

Le molecole ossidanti, come l'acido ipocloroso, possono indurre la produzione di 3-clorotirosina dalla tirosina (*Domingan et al. 1995*), l'istidina può essere ossidata a 2-ossiistidina in reazioni ossidative catalizzate dai metalli che possono avvenire nei siti di legame delle proteine (*Lewis et al 1995*).

Sono state inoltre dimostrate alterazioni dei meccanismi di trasduzione del segnale e dei sistemi di trasporto o dell'attività degli enzimi.

L'ossidazione delle proteine sembra essere, in parte, responsabile di patologie quali l'aterosclerosi, il danno da ischemia-riperfusion e l'invecchiamento (*Berliner et al. 1996*).

1.5 Concetto di ormesi

Numerosi studi hanno ormai chiaramente evidenziato che durante l'esercizio fisico intenso la produzione di ROS e di RNS aumenta sia a livello dei muscoli scheletrici sia a livello cardiaco (*Davies et al. 1982; Sen et al. 1995; Ji et al. 1999*). Tuttavia la letteratura recente ha dimostrato anche che i soggetti sottoposti a programmi a lungo termine di esercizio fisico intenso sono più resistenti allo stress ossidativo, ciò appare principalmente dovuto all'adattamento che subiscono i loro sistemi antiossidanti endogeni (*Powers et al. 1994*).

Alla luce di queste evidenze a partire dagli inizi del terzo millennio alcuni studiosi hanno voluto spiegare le modificazioni indotte dall'esercizio fisico attraverso il concetto dell'ormesi, non solo per quanto riguarda gli adattamenti che coinvolgono il trofismo muscolare o la resistenza alla fatica, ma per quelli che implicano la capacità di contrastare più efficacemente lo stress ossidativo (*Ji et al. 2006; Finkel et al. 2000*). Il concetto di ormesi, che viene preso in prestito dalla tossicologia, indica l'andamento della risposta dei sistemi biologici all'esposizione ad agenti tossici, come potrebbero essere agenti chimici, tossine o radiazioni. Più semplicemente, quindi, in tossicologia il concetto di ormesi rappresenta un andamento a campana della curva dose-risposta di esposizione ad un agente xenobiotico (*Cook et al. 2006*).

Nella figura 1.8 è schematizzato l'andamento della curva dose-risposta dell'esercizio fisico, all'estremo sinistro si può vedere come l'inattività riduca il livello di funzionalità fisica, è infatti noto che un livello troppo basso di attività fisica sia associato ad una lunga serie di patologie come malattie cardiovascolari, diabete mellito di tipo II, atrofia muscolare, obesità e patologie neurodegenerative come il morbo di Alzheimer e di Parkinson (*Booth et al. 2007*).

Allo stesso modo il sovrallenamento, l'estremità destra della curva in figura 1.8, aumenta sia i rischi per la salute sia la frequenza di danni muscolari (*Ogonovszky et al. 2005*).

L'effetto più importante dell'esercizio fisico sull'organismo è, quindi, l'insieme dei processi di adattamento. Come ogni fonte di stress, anche l'esercizio ha la capacità di indurre fenomeni adattativi, anche se solo in un ristretto numero di casi legati alla durata delle sedute di esercizio e all'intensità (*Radak et al. 2001*). L'esercizio fisico, come tutte le fonti croniche di stress, può risultare estremamente pericoloso se il periodo di riposo, inteso come intervallo di tempo in cui la fonte di stress è assente, non è sufficiente. Il riposo infatti è essenziale sia per garantire il recupero

sia per ottimizzare la risposta dell'organismo allo stress. Gli adattamenti che si ottengono con una regolare attività fisica sono sistemici, anche se variano in funzione del tipo di esercizio svolto.

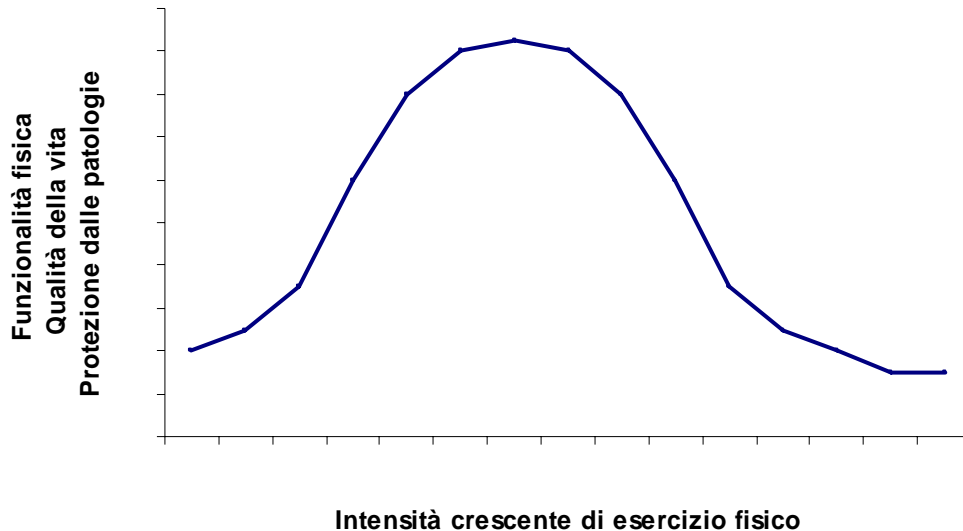


Figura 1.8: andamento della curva dose-risposta per l'esercizio fisico (modificato da Radak et al. 2007)

1.6 Esercizio fisico e produzione di ROS/RNS

È ormai noto da tempo che l'esercizio può aumentare la produzione di ROS/RNS e ciò è particolarmente vero nel caso di singole sessioni di esercizio intenso (Alessio et al. 1988), tanto che nel caso di questo tipo di attività sono stati riportati danni ossidativi a livello sia dei lipidi sia delle proteine sia del DNA (Gomez 2006, Ikeda 2006, Ji et al. 2006).

Sebbene sia necessario suddividere le varie forme di esercizio almeno nelle due principali categorie, ossia, esercizio aerobico ed anaerobico, è comunque possibile affermare che in entrambi i casi l'esercizio determina la produzione di radicali liberi, seppure attraverso vie metaboliche differenti.

1.6.1 Esercizio fisico aerobico e produzione di ROS/RNS

Da un punto di vista biochimico l'aumentata produzione di ROS durante l'esercizio fisico aerobico è dovuta principalmente al fatto che l'ossigeno, riducendosi ad acqua, risulta essere l'accettore finale degli elettroni durante la respirazione mitocondriale permettendo all'organismo di utilizzare l'energia immagazzinata sotto forma di carboidrati, lipidi e

proteine. Durante l'esercizio aerobico, la richiesta di energia da parte dei tessuti è tale da richiedere la mobilitazione di grandi quantità di nutrienti da ossidare nei vari processi metabolici preposti alla produzione di energia. Aumentando, quindi, l'attività di tali vie metaboliche, si rende necessario ridurre ad acqua una maggior quantità di ossigeno. Alcuni studiosi hanno infatti individuato una correlazione positiva tra il livello di VO_2 , raggiunto durante l'esercizio, e lo stress ossidativo generato (*Ashton et al. 1998*).

A livello mitocondriale gli elettroni vengono trasferiti dal NADH fino all'ossigeno attraverso tre complessi enzimatici.

La NADH ubiquinone reduttasi (complesso 1) e la citocromo-c reduttasi (complesso 3) sono noti per essere due siti di formazione di radicali superossido (O_2^-) e perossido di idrogeno (H_2O_2) (*Adam-Vizi et al. 2006*). Ciò è dovuto al passaggio degli elettroni da coenzimi che trasportano due elettroni contemporaneamente, NADH e $FADH_2$, a coenzimi che ne trasportano solo uno, semiubichinone (QH). A questo livello della catena il legame di un elettrone ad una molecola di ossigeno genera O_2^- , che è prontamente ridotto a H_2O_2 ad opera della manganese superossido dismutasi (MnSOD) mitocondriale.

Durante un esercizio massimale, la richiesta di ossigeno dell'intero organismo può aumentare fino a 20 volte, mentre la quantità che raggiunge le fibre muscolari è ancora più elevata. È stato dimostrato che la percentuale di ossigeno che si converte in superossido rimane la stessa indipendentemente dalla quantità di ossigeno consumata, in altre parole l'efficienza della catena di trasporto mitocondriale rimane costante. In condizioni fisiologiche normali è stato stimato che quotidianamente una cellula produce una quantità totale di $3,3 \cdot 10^{-11}$ mmol di ROS (*Ames et al. 1995*). Tuttavia questo è parte integrante della vita cellulare, tanto che l'organismo è in grado di contrastare la presenza di tali ROS attraverso i sistemi antiossidanti, sia endogeni sia esogeni.

In condizioni di stress, quale ad esempio lo svolgimento di un'attività fisica, la quantità di ossigeno consumata, e quindi la quantità di ROS prodotta è molto maggiore che in condizioni normali, pertanto il pool di antiossidanti potrebbe non essere in grado di mantenere il corretto rapporto tra fattori pro-ossidanti e antiossidanti. Questo è tanto più vero quanto più si parla di attività fisiche intense, dove spesso l'organismo non ha a disposizione le riserve antiossidanti necessarie.

1.6.2 Esercizio fisico anaerobico e produzione di ROS/RNS

Nell'esercizio anaerobico, l'aumentata produzione di ROS può avvenire tramite l'attivazione della xantina ossidasi, fenomeni di ischemia

e riperfusione muscolare, fenomeni di carattere infiammatorio (*Sahlin et al. 1992*). Tra questi meccanismi quello che sembra maggiormente coinvolto è quello dell'ischemia riperfusione. Durante l'attività anaerobica, alcuni distretti circolatori possono risultare scarsamente irrorati a causa della redistribuzione del flusso ematico verso i tessuti maggiormente attivi (*Cooper et al. 2002*). Inoltre, a causa delle forti contrazioni muscolari alcuni vasi possono subire una forte riduzione della sezione, il che riduce notevolmente la loro capacità di trasportare ossigeno e nutrienti ai tessuti circostanti. Al termine dell'attività i tessuti vengono poi nuovamente irrorati da un normale flusso ematico. Questo è il fenomeno che va sotto il nome di ischemia/riperfusione.

Così come è dimostrato avvenire nel cuore, anche nei muscoli scheletrici, durante fenomeni di ischemia e riperfusione, si assiste ad una forte attivazione della xantina ossidasi. Durante l'ischemia l'ATP è degradata ad ADP e AMP. Se la quantità di ossigeno non è sufficiente a soddisfare le richieste, l'AMP è degradato a ipoxantina, che viene convertita a xantina e acido urico dalla xantina ossidasi. Tale enzima, attivato da alte concentrazioni di ipoxantina, provoca una riduzione monoelettronica dell'ossigeno, generando così O_2^- al momento della riperfusione (*Heunks et al. 1999*).

In seguito a sessioni di esercizio anaerobico molto intenso, sia nell'uomo che negli animali, si è evidenziato un forte aumento nella quantità di ipoxantina e di acido urico circolanti, questo suggerisce che ci sia un forte incremento nell'attività della xantina ossidasi.

In condizioni aerobiche la maggior quantità di ossigeno garantisce che l'ipoxantina sia degradata ad acido urico ad opera della xantina reduttasi piuttosto che dalla ossidasi (*Ji et al. 1999*).

Inoltre, durante i fenomeni di ischemia riperfusione si osserva anche un aumento delle reazioni di autoossidazione dell'emoglobina e della mioglobina con formazione di O_2^- e H_2O_2 (*Cooper et al. 2002, Brantley et al 1993*).

Come accennato precedentemente, durante gli esercizi anaerobici un'altra fonte di ROS è data, soprattutto durante esercizi eccentrici come la corsa in discesa, dall'attivazione dei sistemi infiammatori (*Childs et al. 2001*). A causa dei danneggiamenti alle fibre muscolari generate da questo tipo di esercizi si assiste alla migrazione dei leucociti polimorfonucleati (PMN) verso i tessuti muscolari danneggiati (*MacIntyre et al. 2000*). È ormai noto che i processi infiammatori possono generare sia ROS sia RNS (*Baran et al. 2004*). L'attivazione di cellule del sistema immunitario, come i PMN, si ha sia durante l'infiammazione acuta che si scatena dopo un trauma, sia durante esercizi eccentrici. In queste condizioni vengono

liberate citochine come IL-1, IL-8, IL-6 e TNF- α che hanno la funzione di stimolare la dilatazione dei vasi richiamando i PMN a livello del tessuto danneggiato. I PMN penetrano nel tessuto e rilasciano alcuni fattori come il lisozima, che ha la funzione di facilitare la precipitazione delle proteine e dei frammenti cellulari, e O₂⁻ prodotto dalla NADPH ossidasi. La liberazione di tali specie ossidanti è considerata indispensabile nella guarigione dai traumi muscolari, ma può anche causare danni ad altre strutture cellulari (*Sen 2001*).

Anche la forte produzione di acido lattico, tipica delle attività anaerobiche, è nota da tempo essere fonte di stress ossidativo; la concentrazione di lattato è, infatti, positivamente correlata alla presenza di marker di perossidazione lipidica come le sostanze reattive all'acido tiobarbiturico (TBARS) (*Lovlin et al. 1987; Kayatekin et al. 2002*). Oltre a questa evidenza è ora dimostrato anche che alte concentrazioni di lattato sono direttamente responsabili della formazione di radicale idrossile attraverso la reazione di Fenton (*Ali et al. 2000*).

1.6.3 Esercizio fisico, stress ossidativo e fatica muscolare

Lo stress ossidativo, derivante da un'eccessiva formazione di specie radicaliche a livello muscolare, è associato a fatica e lesioni muscolari, sia durante la contrazione, sia durante la fase di recupero dopo l'esercizio.

È stato osservato che, quando la formazione di ROS è troppo elevata, la forza muscolare si riduce, mentre cresce la fatica (*Reid et al. 1992*). Numerosi fattori sembrano essere implicati nella fatica muscolare indotta da radicali liberi, tra questi quelli considerati maggiormente rilevanti sono le alterazioni delle funzioni mitocondriale (*Coombes et al. 2002*). I mitocondri sono particolarmente suscettibili al danno ossidativo, indotto dai ROS, a carico di lipidi, proteine e DNA; inoltre i danni al mtDNA possono portare ad alterazioni dei complessi enzimatici della catena respiratoria, con conseguente alterazione del trasporto di elettroni e della sintesi di ATP. Anche il metabolismo aerobico risulta meno efficiente, con conseguente aumentata utilizzazione della via anaerobica. Tutto ciò può avere effetti negativi a livello muscolare, poiché la via anaerobica induce sia un incremento dei livelli di fosfato inorganico (Pi) sia acidosi, che sono i due principali fattori responsabili di fatica muscolare (*Reid et al. 1992*).

Le proteine contrattili (actina e miosina) e la pompa del calcio sono componenti muscolari particolarmente sensibili allo stato redox. Quindi, nel momento in cui aumenta la produzione di ROS e si ha uno squilibrio dello stato redox si possono evidenziare alterazioni a carico sia della contrazione muscolare sia del suo controllo (*Goldfarb et al. 1999*). Inoltre è

stato osservato, durante alcune forme di esercizio come quello eccentrico, un importante rilascio di ferro, sia dalla ferritina sia dall'emoglobina. La liberazione di ferro può aggravare lo stress ossidativo, i danni e l'affaticamento muscolare, sia durante sia in seguito all'esercizio fisico (*Childs et al. 2001*).

Capitolo 2 Stress ossidativo e difese antiossidanti endogene

2.1 Le principali difese antiossidanti endogene

Gli effetti dei radicali liberi possono essere estremamente gravi: la loro possibilità di attaccare teoricamente qualsiasi molecola del nostro organismo determina la produzione di numerosi tipi di danno a livello di cellule, di organi e di apparati. I radicali liberi sono implicati nell'eziopatogenesi di numerose patologie, e nel fenomeno fisiologico dell'invecchiamento.

L'organismo umano possiede dei sistemi di difesa estremamente efficaci, come enzimi in grado di sequestrare direttamente o indirettamente le specie reattive dell'ossigeno, o sostanze che funzionano da trappole chimiche nei confronti dei radicali liberi.

Difese aggiuntive vengono fornite da vitamine, minerali ed altri elementi assunti con la dieta. In generale, queste sostanze non sono sintetizzate dall'organismo ed hanno funzioni correlate con i sistemi enzimatici quali cofattori, coenzimi, elementi in tracce legati a ligandi organici o hanno essi stessi proprietà antiossidanti.

Gli antiossidanti si possono classificare in antiossidanti primari e secondari. Questa classificazione si basa non su un criterio di importanza, ma di sequenza temporale di azione. Fra i primari vi sono gli enzimi che catalizzano le trasformazioni dei ROS (SOD, CAT e GPx), le molecole chelanti i metalli e le molecole in grado di agire come scavenger dell'ossigeno singoletto ($^1\text{O}_2$). Gli antiossidanti secondari hanno, invece, la funzione di implementare le difese antiossidanti ripristinando, per esempio, il pool dei tioli oltre ad agire di per se come scavenger dei radicali liberi, fra questi ricordiamo: le vitamine A ed E, la vitamina C, il coenzima Q, e i polifenoli.

Gli scavenger idrofobici si trovano nelle membrane cellulari dove inibiscono o interrompono reazioni a catena della perossidazione lipidica. Gli scavenger idrofilici si trovano nel citosol, nei mitocondri e nel nucleo.

Nei paragrafi successivi verrà focalizzata l'attenzione sui principali antiossidanti primari.

2.1.1 Antiossidanti primari: enzimi protettivi

Gli enzimi con funzione antiossidante sono deputati alla distruzione di superossidi e idroperossidi. Il vantaggio che deriva dalla loro azione è che la concentrazione di perossidi allo stato stazionario può essere adattata ai requisiti della cellula: molti enzimi possono essere indotti, inibiti o attivati da effettori endogeni (*Harris et al. 1992*).

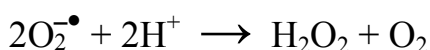
La degradazione enzimatica del superossido è assicurata dalla SOD, mentre quella dell'idroperossido è realizzata da CAT, GPx o ascorbato perossidasi. Sia SOD che CAT sono delle dismutasi, in questo modo, le reazioni primarie catalizzate da questi enzimi non sono associate ad alcun costo energetico. Al contrario la GPx e l'ascorbato perossidasi sono delle reduttasi i cui substrati ridotti sono rigenerati dagli equivalenti di NADPH prodotti nelle vie metaboliche (*Chaudiere et al. 1999*).

2.1.2 Superossido dismutasi

La famiglia delle SOD è costituita da metalloenzimi ampiamente distribuiti sia nelle cellule eucariote che procariote (*Fridovich 1995*). La caratteristica che accomuna tutte le isoforme della SOD è la capacità di catalizzare la dismutazione dell'anione superossido ($O_2^{\bullet-}$) a perossido di idrogeno (H_2O_2).

Le diverse isoforme dell'enzima, codificate da geni diversi, si caratterizzano, oltre che per il diverso catione metallico che funge da cofattore, anche per la diversa compartimentazione; si distinguono una SOD1 citoplasmatica, una SOD2 mitocondriale e una SOD3 extracellulare. Per quanto riguarda la classificazione delle isoforme in funzione dei diversi cationi metallici contenuti si distinguono una Cu, Zn SOD, principalmente intracellulare, una Mn SOD, principalmente mitocondriale, mentre in alcuni procarioti e piante sono state individuate anche la Ni SOD e la Fe SOD.

La SOD catalizza la dismutazione del superossido in perossido di idrogeno ed ossigeno.



A pH fisiologico la velocità di dismutazione non enzimatica è significativa, ma è notevolmente maggiore in presenza di SOD, che determina un aumento della velocità di dismutazione del radicale superossido di 1000 volte.

Il fatto che la concentrazione intracellulare del $O_2^{\bullet-}$ vari da 10^{-6} a 10^{-5} M, ne mette in evidenza la forte tossicità.

Un esempio della citotossicità del superossido si ha con la veloce produzione di perossinitriti ($ONOO^-$) nella reazione del superossido con l'ossido nitrico. Il perossinitrito, in equilibrio con il suo acido coniugato ($pK_a \sim 6.8$), si comporta come un potente ossidante. In figura 2.1 è schematizzata la capacità della SOD di sequestrare il $O_2^{\bullet-}$ riducendo così la possibilità che questo reagisca con le principali macromolecole dell'organismo.

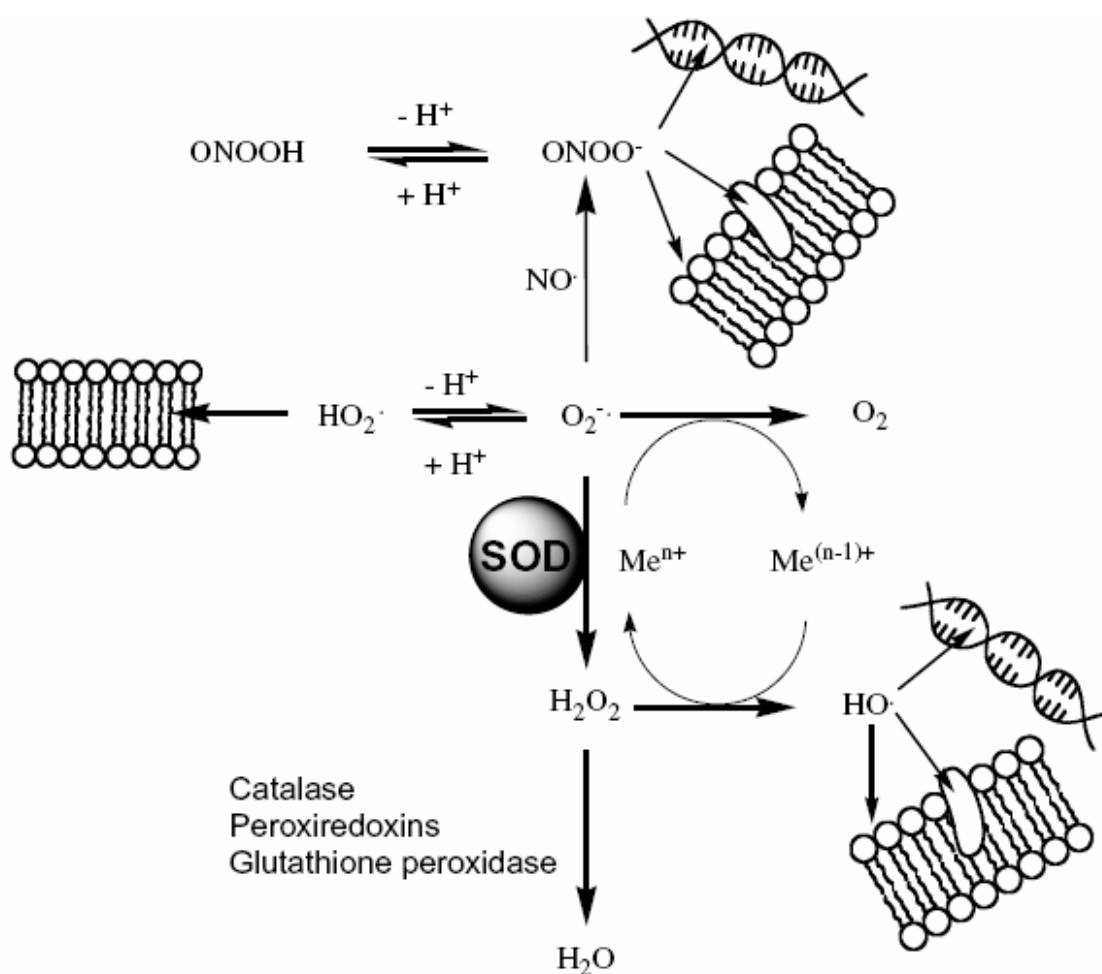
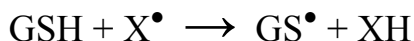
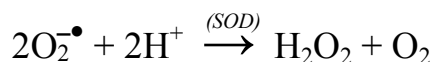
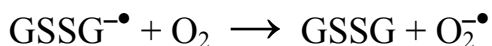
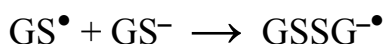


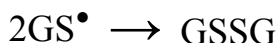
Figura 2.1: ruolo della SOD come scavenger di specie reattive dell'ossigeno (Johnson et al., 2005)

Se il radicale idrofilico X^{\bullet} è sequestrato da GSH in presenza di concentrazioni fisiologiche di ossigeno (20-50 mM), l'attività della superossido dismutasi sposta la seguente sequenza di reazioni verso destra:





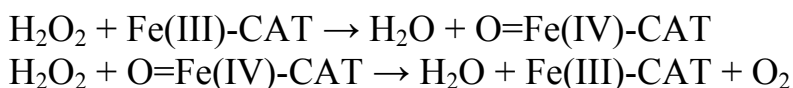
Questa sequenza di reazioni by-passa la diretta ricombinazione di radicali GS^{\bullet} :



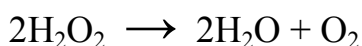
Tutto ciò potrebbe avere il vantaggio di prevenire reazioni collaterali indesiderate di GS^{\bullet} (*Chaudiere et al. 1999*).

2.1.3 Catalasi

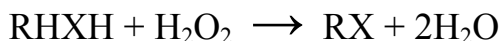
La CAT è un enzima tetramericico ad alto peso molecolare contenente porfirina. La funzione principale di questo enzima è quella di eliminare il perossido di idrogeno (H_2O_2) ad elevate concentrazioni catalizzando la sua dismutazione ad ossigeno e acqua attraverso una reazione che avviene in due passaggi:



La reazione netta risultante è quindi:



A basse concentrazioni di perossido di idrogeno l'enzima si comporta, invece, come una perossidasi utilizzando co-substrati riducenti come alcol, ascorbato e fenoli (*Kirkman et al., 1987*):



2.1.4 Glutatione perossidasi e glutatione reduttasi

Nella detossificazione di H_2O_2 , la GPx, un enzima selenio-dipendente, converte H_2O_2 ad acqua attraverso l'ossidazione di glutatione ridotto (GSH) a glutatione ossidato (GSSG). La GPx esiste anche in una

forma insolubile associata alle membrane (fosfolipide idroperossido glutatione perossidasi), che agisce sugli idroperossidi dei fosfolipidi della membrana stessa (*Ursini et al. 1986*). Il GSSG può ritornare alla forma ridotta ad opera della glutatione reduttasi (GSHred). GSHred è una flavoproteina che permette di convertire GSSG in GSH attraverso l'ossidazione del NADPH a NADP⁺; questa reazione è essenziale per la disponibilità di GSH in vivo. La GPx interviene anche nella rigenerazione della forma attiva della vitamina E e della vitamina C.

2.2 *L'esercizio fisico stimola le difese antiossidanti endogene*

Come è stato precedentemente riportato secondo molti autori un'attività fisica moderata e continuata stimola le difese antiossidanti dell'organismo ad adattarsi alle nuove condizioni di aumentato stress ossidativo (*Hollander et al 1999*). Studi condotti sia sull'uomo che su modelli animali hanno concluso che l'esercizio aerobico è in grado di stimolare, anche in tempi molto brevi, l'attività dei principali enzimi antiossidanti, come SOD, CAT e GPx, sia nel tessuto muscolare sia a livello ematico (*Leeuwenburgh et al. 1999*). Quando i soggetti studiati rientrano in un programma di allenamento controllato di esercizio aerobico l'attività di questi enzimi aumenta soprattutto nei tessuti che presentano un'alta capacità ossidativa come le fibre muscolari di tipo I, tanto che in soggetti ben allenati la produzione di ROS risulta molto ridotta, se non trascurabile in seguito all'attività stessa (*Inal et al. 2001*).

Per quanto riguarda gli effetti dell'allenamento e degli esercizi anaerobici sull'attività degli enzimi antiossidanti i risultati sono controversi e di più difficile interpretazione. Alcuni studi hanno infatti mostrato un incremento dell'attività degli enzimi antiossidanti (*Childs et al. 2001*) mentre altri non hanno identificato nessuna variazione dell'attività di SOD e GPx (*Groussard et al. 2003*). Sebbene l'attività degli enzimi antiossidanti sia di primaria importanza nel contrastare gli effetti delle ROS non bisogna sottovalutare l'importanza dei sistemi cellulari deputati a riparare gli eventuali danni indotti dallo stress ossidativo. Radak e colleghi (*Radak et al. 2000*) hanno dimostrato che, in un modello animale, l'esercizio fisico regolare aumenta l'attività del complesso del proteasoma a livello del miocardio e riduce i livelli di proteine carbonilate, un noto marker di danno ossidativo. In questo studio i ratti precedentemente allenati erano sottoposti ad un trattamento con acqua ossigenata prima della valutazione dell'attività del proteasoma e dei livelli di proteine carbonilate. Gli autori hanno evidenziato che i ratti allenati presentavano una maggior attività del complesso del proteasoma e minori livelli di proteine carbonilate rispetto ai ratti sedentari di controllo, che avevano subito lo stesso trattamento con acqua ossigenata, concludendo che l'esercizio oltre ad aumentare la resistenza allo stress ossidativo, aumenta anche l'attività dei sistemi di riparazione. Gli stessi autori hanno anche dimostrato che questa osservazione può essere estesa anche ai sistemi di riparazione del DNA (*Radak et al. 2003*); infatti, studiando un gruppo di maratoneti hanno evidenziato che questi soggetti presentano, a livello muscolare, un'elevata attività della 8-oxoguanina DNA glicosilasi 1 (OGG1), enzima

fondamentale per la riparazione del danno ossidativo al DNA, concludendo che l'up-regolazione degli enzimi di riparo del DNA può essere il meccanismo attraverso cui l'esercizio protegge il DNA dal danno ossidativo.

L'aumento dell'attività degli enzimi antiossidanti e dei meccanismi di riparazione mediati dallo stress ossidativo indotto dall'esercizio possono quindi giocare un ruolo di primo piano nel ridurre l'incidenza delle patologie associate al danno ossidativo, come malattie cardiovascolari, morbo di Alzheimer e alcuni tipi di cancro (*Perry et al. 2005; Yu et al. 2006*). Non a caso una moderata attività fisica aerobica viene suggerita anche dalle linee guida del ministero della salute per la prevenzione delle patologie cardiovascolari e della sindrome metabolica in generale.

2.3 L'esercizio modula le difese antiossidanti attivando vie di trasduzione del segnale e fattori di trascrizione

Molti tentativi sono stati fatti per cercare di aumentare il livello di antiossidanti nell'organismo, come: la prescrizione di diete particolari, la supplementazione di antiossidanti con la dieta e la somministrazione di antiossidanti di sintesi. Tuttavia nessuna di queste strategie ha mostrato di innalzare sufficientemente le difese dell'organismo (*Ji, 2002*). È stato osservato che individui che si sottopongono ad un allenamento moderato e costante presentano, nei muscoli, livelli di enzimi antiossidanti maggiori rispetto a individui sedentari, ed inoltre risultano più resistenti allo stress indotto dall'esercizio stesso (*Ji, 1995; Sen, 1995*). Probabilmente questo adattamento deriva dall'effetto che più sessioni di esercizio hanno sull'espressione dei geni che codificano per enzimi antiossidanti.

Le cellule sono dotate di fattori di trascrizione che possono essere attivati dallo stress ossidativo.

Alcuni di tali fattori sono: NF-kB, una proteina da shock termico (HSF-1), p53, e MAPK.

Le ROS sono in grado di attivare proteine chinasi che hanno la funzione di fosforilare residui di serina presenti sulla subunità inibitoria (I-kB) di NF-kB. Ciò provoca un'attivazione del fattore di trascrizione che migra nel nucleo e si lega ad alcuni promotori stimolando la trascrizione. Recentemente si è notato che una singola sessione di allenamento muscolare può attivare la via della MAPK nei muscoli scheletrici, tanto che l'attività chinasi risulta essere triplicata un'ora dopo lo sforzo (*Krook et al. 2000*). L'attivazione di queste chinasi porta alla fosforilazione di proteine coinvolte nel processo di attivazione del fattore di trascrizione AP-1.

Alcuni enzimi antiossidanti, come MnSOD contengono, nelle sequenze promotrici dei loro geni, siti di legame per NF-kB e AP-1, di conseguenza sono coinvolti in un processo di up-regulation attivato dall'esercizio. A sostegno di questa affermazione uno studio (*Hollander et al 2001*) ha valutato l'andamento dell'espressione del gene della MnSOD in seguito ad una singola sessione di esercizio intenso nei muscoli di ratto. Si è notato che, dopo circa due ore dall'allenamento, la quantità di NF-kB legato al promotore era aumentata in modo significativo, e rimaneva elevata per le successive 48 ore.

Anche per quanto riguarda il legame del fattore AP-1 è stato individuato un significativo aumento dopo la sessione di esercizio, tale aumento è risultato massima dopo 30 minuti dall'esercizio e ritornava ai

livelli basali nel giro di poche ore. La quantità di mRNA risultava aumentata, ma a tale aumento corrispondeva un incremento di espressione dell'enzima sfalsato nel tempo di 48 ore.

Questi dati suggeriscono che, mentre una sessione intensa di esercizio può indurre uno stress ossidativo sufficiente ad attivare la trascrizione del gene per la MnSOD, per avere un effettivo incremento della quantità di proteina sintetizzata è necessario che lo stimolo ossidativo, l'esercizio, sia prolungato e ripetuto nel tempo. Da qui l'ipotesi che un'attività aerobica moderata e continuativa abbia maggiori effetti sulla stimolazione delle difese antiossidanti.

2.4 *Esercizio fisico acuto ad esaurimento: una fonte di stress ossidativo e causa di danni muscolari*

Gli effetti benefici dell'esercizio fisico e dell'allenamento visti finora, vengono completamente revertiti quando si parla di esercizio fisico acuto ad esaurimento.

L'esercizio fisico acuto ad esaurimento è accompagnato dall'aumento della perossidazione lipidica, dalla riduzione del rapporto GSH/GSSG e dall'aumento dei danni ossidativi a carico delle proteine. Questo aumentato stress ossidativo può, almeno in parte, essere responsabile delle micro lesioni muscolari tipiche di questo tipo di esercizio; si assiste infatti, al rilascio nel flusso ematico di enzimi citosolici quali creatina chinasi e lattico deidrogenasi (*Vina et al 2000*). La sequenza di eventi che sembrano coinvolti in questo meccanismo comprendono nell'ordine: un'iniziale frattura meccanica dei sarcomeri, uno squilibrio dell'accoppiamento tra eccitazione e contrazione ed infine, un aumento delle vie di degradazione calcio sensibili. Tutto questo si traduce poi nella riduzione della forza di contrazione, dolori muscolari, attivazione della risposta infiammatoria con infiltrazione leucocitaria e rilascio di citochine proinfiammatorie, meccanismo noto per essere fonte di specie reattive sia dell'ossigeno sia dell'azoto (*Jamurtas et al. 2005; Peake et al. 2005; Baran et al. 2004*).

Durante il corso di esercizi acuti ad esaurimento si assiste ad un incremento del rapporto lattato/piruvato. Questo rapporto aumenta dal momento in cui i meccanismi aerobi di produzione dell'energia non sono più in grado di sopperire alle richieste energetiche dell'esercizio e devono quindi essere coinvolti i meccanismi anaerobi. Alcuni autori hanno riscontrato una correlazione positiva tra l'aumentato stress ossidativo, indicato come aumento del rapporto GSSG/GSH, e l'aumento della sintesi di lattato (*Sastre et al. 1992*)(figura 2.2).

L'aumento del rapporto lattato/piruvato sembra suggerire che al termine di un esercizio ad esaurimento i soggetti si trovano in una condizione almeno parzialmente anaerobica. A conferma di tale ipotesi *Vina et al. (Vina et al. 2000)* hanno proposto e dimostrato che lo stress ossidativo, indotto dall'esercizio acuto ad esaurimento, sia principalmente causato da una forte attivazione della xantina ossidasi piuttosto che da un aumento della produzione di ROS a livello mitocondriale. Essi hanno notato non solo un aumento dell'attività della xantina ossidasi, ma anche che questo forte stress ossidativo può essere prevenuto dalla somministrazione di un inibitore della XO, come l'allopurinolo, sia in ratti che in soggetti umani.

In conclusione, risulta evidente come un esercizio acuto e ad esaurimento, rappresenti un modello di stress ossidativo e muscolare che eccede le normali capacità dell'organismo di mantenere l'equilibrio tra fattori pro ed antiossidanti.

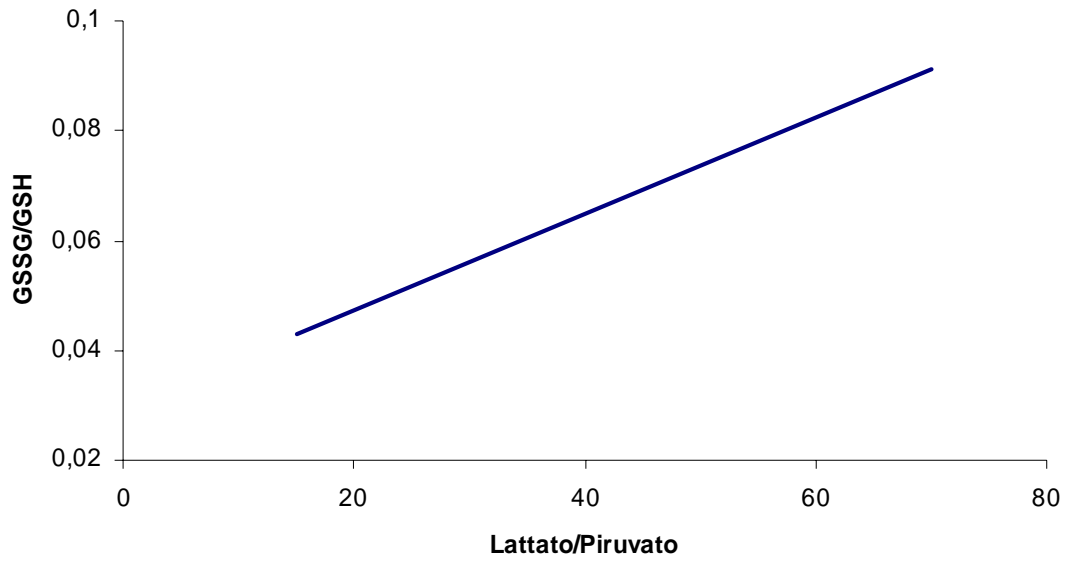


Figura 2.2: correlazione tra marcatori di stress ossidativo e aumento della liberazione di lattato nel flusso ematico. (modificato da Sastre et al. 1992).

Capitolo 3 *I Glucosinolati ed il sulforafane*

3.1 *Struttura chimica e proprietà*

I glucosinolati (GLS) costituiscono un vasto gruppo di fitocomponenti presenti in molte famiglie di dicotiledoni angiosperme. In particolare sono presenti in elevate quantità nei vegetali della famiglia delle Brassicaceae o Crucifereae come broccoli, cavoli, cavolfiori e cavolini di Bruxelles. Nelle piante, i GLS, ed i loro prodotti di degradazione, hanno proprietà fungicide, battericide, nematocide e la loro composizione varia in funzione della specie, del clima e delle condizioni di coltivazione (*Fahey et al. 2001*). Sono inoltre responsabili dell'odore e del gusto pungenti, tipici delle Crucifereae.

Dal punto di vista biologico i GLS sono composti relativamente inattivi, ma, quando vengono a contatto con la mirosinasi, un enzima che coesiste con i GLS nelle piante ma fisicamente separato da essi, formano diversi prodotti di idrolisi con differenti attività biologiche. Tra questi, gli isotiocianati (ITC), sono quelli che hanno maggiormente attirato l'attenzione dei ricercatori, a causa delle loro interessanti proprietà biologiche. In particolare, il sulforafane (SF) (1-isotiocianato-(4R)-(metilsulfinil)butano), un ITC prodotto a seguito dell'idrolisi del corrispondente glucosinolato glucorafanina, è stato ampiamente studiato per le sue proprietà chemiopreventive e antinfiammatorie.

La struttura base dei GLS è costituita da un β -D-tioglucosio, un'ossima sulfonata ed una catena laterale variabile derivata da metionina, triptofano, fenilalanina o vari amminoacidi ramificati (figura 3.1). La catena laterale ed il gruppo solfato possono presentare due diverse configurazioni stereochimiche attorno al doppio legame C=N. La struttura della catena laterale è molto variabile e può presentare gruppi alifatici (alchili, alchenili, idrossialchenili, ω -metiltioalchili, ω -sulfinili e ω -sulfonilalchili), aromatici (benzili e benzili sostituiti) o eterocicli (indolo) e sono proprio tali gruppi a determinare le proprietà chimico-fisiche degli ITC derivanti dall'idrolisi dei GLS.

Il gruppo solfato presente nella molecola le conferisce caratteristiche fortemente acide, così i GLS si trovano di norma sotto forma di sali con il potassio come controione, hanno caratteristiche idrofile e non sono volatili.

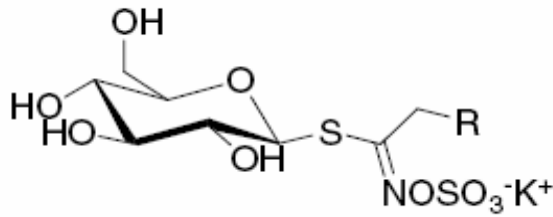


Figura 3.1: Struttura base dei glucosinolati

3.2 *Fonti alimentari*

Le piante più ricche di GLS appartengono alla famiglia delle Brassicaceae e comprendono vegetali comunemente consumati come cavoli, broccoli, cavolfiore e cavolini di Bruxelles, radici come il ravanello, la rapa e la rapa svedese, vegetali in foglia come la rucola e salse come senape e wasabi. I GLS nelle piante variano sia qualitativamente che quantitativamente a seconda della specie, del tipo di tessuto considerato, dell'età e della salute della pianta e naturalmente dei fattori ambientali (pratiche agricole, condizioni climatiche). Molto importanti sono anche i processi di cottura cui sono sottoposti, che spesso portano ad una riduzione nel contenuto di GLS. Per esempio, 150 g di broccoli freschi possono fornire da 56 a 112 mg di SF, valore che diminuisce se i broccoli vengono cotti, o se sono conservati per lungo tempo. La migliore fonte di glucorafanina, il precursore di SF, sono i germogli di broccoli di 3 giorni. Questi contengono da 10 a 100 volte più glucorafanina dei broccoli maturi. A renderli ancora più interessanti, dal punto di vista nutrizionale, è il fatto che contengono basse quantità di glucosinolati indolici, che sono considerati potenziali agenti promotori tumorali (*Fahey et al. 1997*). Sebbene siano state descritte più di 120 strutture di GLS, sono relativamente poche quelle presenti nelle *Brassicaceae* normalmente assunte con la dieta. Tra i GLS più significativi, il 3-butenilico, il 4-pentenilico e le loro forme idrossilate sono contenute principalmente nel cavolo Cinese e in altre specie di *Brassica rapa* e *Brassica oleracea*; il 3-metiltiopropil, il 3-metilsulfinilpropil, il 2-propenil e il 4-metilsulfinilpropil glucosinolato nei broccoli, cavoli e cavolfiore; il feniletil glucosinolato ed il 4-metiltiobutil glucosinolato nel crescione. Il feniletil, il 2-propenil ed il 4-metiltiobutil isotiocianato risultano piccanti, mentre il 3-butenil ed il 4-pentenil isotiocianato hanno un sapore più acre. Il sulforafane è il più idrofilo degli ITC assunti con la dieta, ma, a differenza della maggior parte di questi, contribuisce poco al sapore.

3.2.1 Idrolisi

I GLS sono chimicamente e termicamente stabili, quindi l'idrolisi è prevalentemente di tipo enzimatico. La mirosinasi è una β -tioglucosidasi che viene rilasciata quando i tessuti vegetali vengono danneggiati, come, per esempio, durante la raccolta e il trasporto delle piante, oppure in seguito alla masticazione. L'enzima causa l'idrolisi del legame tioglucosidico producendo glucosio ed un aglicone instabile, il tioidrossiammato-*O*-sulforafane, che a seguito di un riarrangiamento spontaneo, porta a differenti prodotti, la cui struttura chimica dipende dalle condizioni di reazione (pH, presenza o meno di Fe^{2+} e specifiche proteine) e dalla catena laterale dei GLS da cui originano (Figura 3.2a). L'enzima, analizzato ai raggi X, presenta una struttura dimerica legata da un atomo di zinco, e una caratteristica forma cosiddetta "a barile" (Figura 3.2c). Una peculiarità della mirosinasi presente nelle piante è la sua attivazione ad opera dell'acido ascorbico, questo, infatti, agisce con un effetto allosterico sull'attività dell'enzima (*Burmeister et al. 2000*).

A pH 6-7 i prodotti più comuni sono gli ITC, che si formano dai GLS per azione della mirosinasi e successivo riarrangiamento di Lossen (Figura 3.2b) (*Bones et al., 2006*). La cinetica dell'enzima differisce da specie a specie e più isoforme possono esistere anche all'interno della stessa pianta. In aggiunta all'enzima presente nelle piante, sono state identificate mirosinasi nei funghi, negli afidi e nei batteri, in particolare in batteri presenti nella microflora animale e umana. Ciò risulta molto importante in quanto con la cottura dei cibi, la mirosinasi presente nei tessuti vegetali viene inattivata e i GLS ingeriti intatti vengono convertiti a ITC dalle mirosinasi presenti nella microflora intestinale. Nel complesso comunque l'assorbimento e l'escrezione risultano sostanzialmente inferiori nei vegetali cotti rispetto a quelle crudi (*Fahey et al. 2001*).

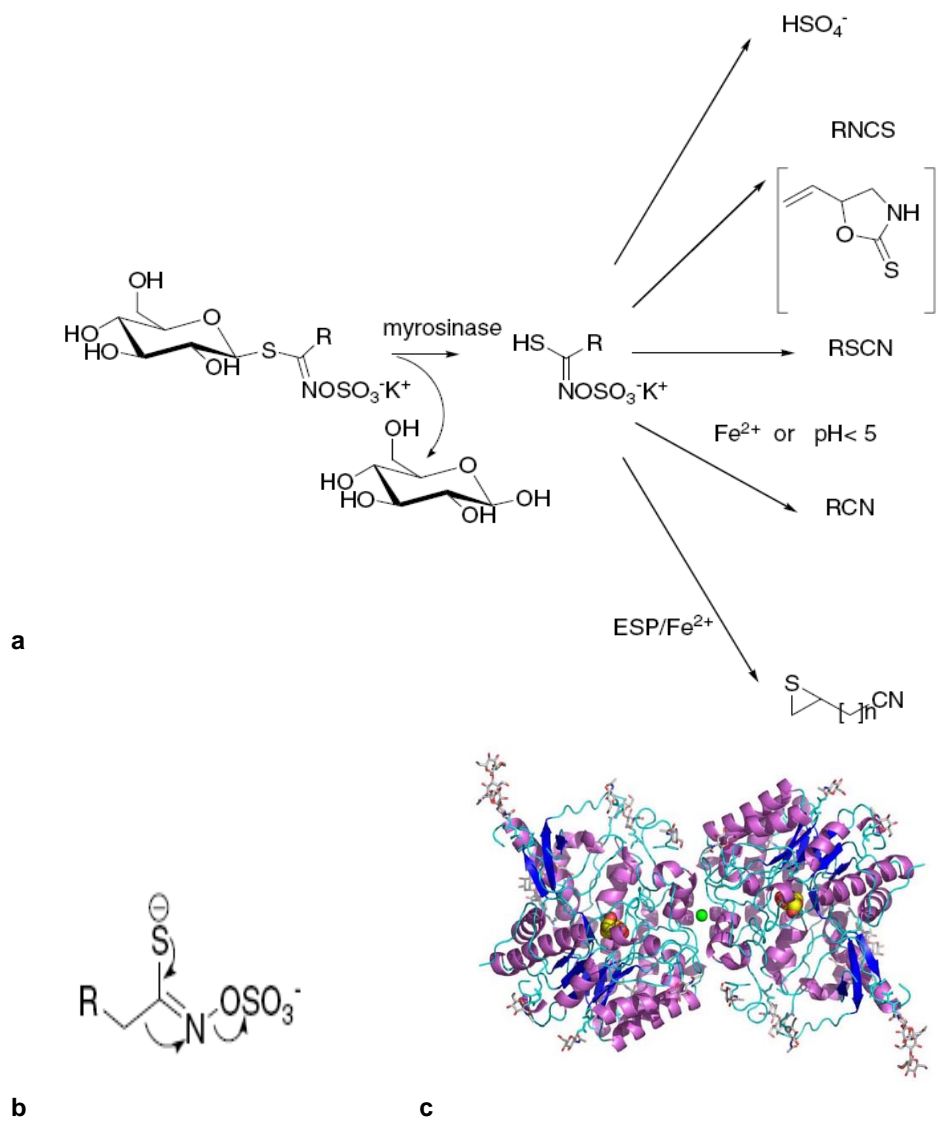


Figura 3.2: a) Schema dei vari prodotti di idrolisi derivanti dall'azione della mirosinasi sui glucosinolati b) Riarrangiamento di Lossen che conduce alla formazione di ITC c) Struttura dimerica della mirosinasi con un atomo di zinco al centro (Bones et al., 2006).

3.3 *Metabolismo*

Per capire se un fitocomponente presente negli alimenti può svolgere un ruolo nel mantenimento della salute, risulta fondamentale conoscere il suo metabolismo all'interno dell'organismo e la sua biodisponibilità, intesa come quantità di composto che raggiunge la circolazione sistemica.

Il normale processo che una qualsiasi sostanza segue all'interno dell'organismo viene suddiviso in diverse fasi: liberazione, assorbimento, distribuzione, metabolismo ed escrezione.

3.3.1 *Liberazione e assorbimento*

Per liberazione si intende il rilascio del composto dalla matrice alimentare e la sua dissoluzione nei fluidi biologici. Questa fase è indispensabile per fare in modo che il composto arrivi, a livello della mucosa intestinale, in una forma che gli permetta di essere assorbito dagli enterociti, attraverso diffusione passiva, passaggio attraverso le giunzioni cellulari o utilizzando trasportatori specifici.

La liberazione dei GLS dalla matrice vegetale e la loro trasformazione a ITC dipende da svariati fattori:

- concentrazione di GLS nelle piante e tipo di matrice vegetale
- idrolisi dovuta a danneggiamento dei tessuti vegetali durante lavorazioni e immagazzinamento
- caratteristiche chimico-fisiche dei GLS e corrispondenti ITC e loro stabilità
- livello di rottura dei tessuti durante la masticazione
- efficienza digestiva e dei processi intestinali
- azione della microflora intestinale

La dissoluzione di un composto e il suo assorbimento sono determinati dalla sua solubilità in ambiente acquoso, dalla ionizzazione (pK_a), e dalla lipofilia, definita dal coefficiente di partizione acqua-ottanolo ($\log P$), che risulta un fattore cruciale per la partizione passiva ai lati della membrana plasmatica. È stato suggerito che l'assorbimento intestinale sarebbe ottimale per un $\log P$ compreso tra 0.5 e 2.0. Il gruppo solfato presente nella struttura dei GLS li rende fortemente acidi, e per un GLS intatto si può predire una pK_a di circa 1.9. Con tale pK_a la diffusione passiva può avvenire solamente a livello dello stomaco, ma, questo, avendo solo una piccola superficie disponibile, non costituisce il maggior sito di assorbimento. I GLS sono composti ionizzati e idrofili, motivo per cui non permeano facilmente la membrana cellulare. È stato quindi predetto che

vengano assorbiti attraverso pori acquosi o mediante trasporto attivo. La presenza di un gruppo glucoside nella molecola potrebbe suggerire il trasporto attivo attraverso il trasportatore del glucosio ma studi in vitro hanno dimostrato che nessuno dei GLS viene attivamente assorbito lungo il tratto dell'intestino preso in esame, come avviene per il glucosio. È stato invece riscontrato un passaggio per trasporto facilitato.

A differenza dei composti di partenza, la maggior parte dei prodotti di degradazione dei GLS non ha gruppi acidi o basici e così, per esempio, si può predire che il log P sia indipendente dal pH e abbia un valore compreso tra 0.2 e 4.4. Sono inoltre composti molto più lipofili e hanno un peso molecolare relativamente basso. L'assorbimento di tali prodotti di degradazione non mostra saturazione, confermando così un meccanismo di diffusione passiva.

SF ha un peso molecolare di 177 g/mol e un log P di 0.72 (*Cooper et al. 1997*), per cui una volta formatosi, a livello del cavo orale in seguito a masticazione o nell'intestino ad opera della microflora, viene rapidamente assorbito, come dimostrato in uno studio condotto da Petri, nel quale l'effettiva permeabilità intestinale del SF viene stimata pari a $18.7 \pm 12.6 \times 10^{-4}$ cm/s e la percentuale di assorbimento pari a $74 \pm 29\%$ (*Petri et al. 2003*).

Gli ITC all'interno della cellula vengono coniugati con il glutatione (GSH), ad opera dell'enzima glutatione-S-transferasi. È stato dimostrato che elevati livelli cellulari di GSH corrispondono ad un aumento dell'uptake di ITC nella cellula. Inoltre, l'uptake iniziale aumenta linearmente con l'aumento di una specifica glutatione-S-transferasi, e non sembra essere influenzato dalla lipofilicità degli ITC (*Zhang 2001*). In alcuni studi su animali è stato dimostrato che gli ITC possono anche essere coniugati con cisteina ma, è verosimile pensare, che tali prodotti si dissocino prima di essere assorbiti dalla cellula mediante diffusione passiva e vengano poi coniugati a livello intracellulare con il GSH (*Brusewitz et al. 1977; Gorler et al. 1982*). L'equilibrio tra ITC liberi e legati è la proprietà chiave che facilita il passaggio attraverso la membrana cellulare e, la coniugazione con GSH all'interno della cellula è la forza guida per la diffusione passiva e l'accumulo di ITC.

Oltre che dalle caratteristiche del composto in esame comunque, l'assorbimento dipende anche da svariati fattori fisiologici quali l'espressione di determinati trasportatori, il riempimento gastrico, la motilità gastrointestinale, il pH, il flusso sanguigno e linfatico e la presenza di stati patologici. Tutti questi parametri non sono fino ad ora stati considerati negli studi sull'assorbimento dei GLS e derivati.

3.3.2 Distribuzione

Per distribuzione si intende il movimento di un composto dal sito di somministrazione ai vasi ed ai tessuti. I principali parametri che condizionano la distribuzione sono il flusso sanguigno, le barriere create dalle membrane, l'affinità per i tessuti e la presenza nel sangue di proteine plasmatiche quali albumina e glicoproteine, che legano i composti e li trasportano attraverso il circolo sanguigno. Finché un composto si trova legato a tali proteine non è in grado di raggiungere il suo sito d'azione e non può svolgere alcuna azione biologica. Risulta quindi importante verificare quale frazione del composto assorbito risulta libera, cioè non legata alle proteine plasmatiche. Tale valore dipende, sia dalla concentrazione del composto sia da quella delle proteine e naturalmente dalla costante di associazione che caratterizza il legame. Per quanto riguarda i GLS, non ci sono molti dati disponibili sulla loro distribuzione nell'organismo ma, data la loro struttura chimica e le loro proprietà, appare inverosimile che possano essere assorbiti e distribuiti immodificati nell'organismo umano.

I loro prodotti di degradazione o i metaboliti di questi ultimi sono invece distribuiti in tutto l'organismo e raggiungono differenti tessuti. La mancanza di metodologie per determinare basse concentrazioni di ITC nel sangue e nei tessuti spiega le scarse conoscenze disponibili sulla loro distribuzione nell'organismo e sulla loro biodisponibilità sistemica. Solo recentemente *Ye et al. (2002)* hanno sviluppato un metodo appropriato e sensibile, che ha reso possibili gli studi di farmacocinetica nell'uomo. È stato osservato che, in seguito ad un rapido assorbimento e comparsa nel plasma ($0.94 \pm 2.27 \mu\text{mol/L}$), i livelli di picco degli ITC provenienti dai broccoli (in maggioranza sulforafane, iberina ed euricina), diminuiscono, dimostrando una rapida distribuzione, che segue una cinetica del primo ordine con una emivita di 1.77 ± 0.13 ore (*Ye et al. 2002*).

Da uno studio, effettuato somministrando a dei ratti ITC marcati con carbonio 14, si è visto che elevati livelli di ITC si vengono a trovare rapidamente nello stomaco e nell'intestino, concentrazioni intermedie si trovano nel pancreas e nella milza e bassissime concentrazioni sono state identificate a livello di cuore e cervello (*Conaway et al. 1999*).

Gli ITC sono trasportati nel sangue probabilmente legati alle proteine plasmatiche e, solo in piccola parte, in forma libera. La distribuzione ai singoli tessuti coinvolge il passaggio dei composti attraverso le membrane e questo segue lo stesso meccanismo di uptake descritto per l'assorbimento intestinale. La forza guida per la diffusione passiva degli ITC attraverso le membrane è la coniugazione con il GSH. In base a questi dati è quindi

possibile ipotizzare che gli effetti organo-specifici degli ITC dipendano dalla concentrazione di GSH nei diversi tessuti (*Temminck et al. 1986*).

3.3.3 *Metabolismo ed escrezione*

La biodisponibilità di un composto, anche se assorbito in elevate concentrazioni, può essere limitata da un rapido ed esteso metabolismo. Risulta quindi importante determinare quali sono i metaboliti di tale composto e in che concentrazioni si ritrovano nel sangue, nelle urine o nelle feci.

Il fatto che non siano presenti GLS intatti nelle feci suggerisce che questi composti siano sottoposti ad un esteso metabolismo. Sono, però, ancora poche le informazioni sulle reazioni cui sottostanno e, la mancanza di un valido strumento per la determinazione dei loro metaboliti nel plasma, ha fatto sì che gli studi si concentrassero sulla misura dell'escrezione dei metaboliti nelle urine e nelle feci. I maggiori composti di escrezione urinaria nell'uomo sono i coniugati con N-acetilcisteina, che sono stati usati come biomarcatori urinari dell'esposizione dietetica ai glucosinolati.

Come già detto, i GLS vengono idrolizzati a ITC ad opera dell'enzima mirosinasi a livello del cavo orale in seguito a liberazione dell'enzima dalla matrice vegetale, o a livello intestinale ad opera della microflora. Il primo passo del metabolismo degli ITC è la coniugazione con GSH. Non è chiaro se questa coniugazione avvenga nel duodeno durante l'assorbimento, oppure nel fegato, che è il sito con la più alta attività glutatione transferasica. Successivamente, gli ITC coniugati vengono metabolizzati da differenti enzimi quali ad esempio la glutamiltranspeptidasi, la cisteinilglicinasi e la N-acetiltransferasi che portano alla formazione dei diversi metaboliti mostrati in figura 3.3.

Tale sequenza di reazioni conduce di norma alla formazione di acido mercapturico, un metabolita che, data la sua idrofilia, può facilmente essere escreto con le urine (*Keum et al. 2004*) (Fig.3.3).

In seguito a somministrazione di 100 g di broccoli, nelle urine sono stati identificati sia il SF libero che i suoi metaboliti SF-N-acetilcisteina, SF-cisteina e SF-cisteinglicina in concentrazioni da 1 a 16 μM e il composto SF-N-acetilcisteina è stato identificato come il maggior metabolita. Le concentrazioni trovate nel plasma raggiungono 0.80 μM (SF-cisteina) dopo un'ora dalla somministrazione e diminuiscono fino a 0.20 μM dopo 6 ore (*Al Janobi et al. 2006*).

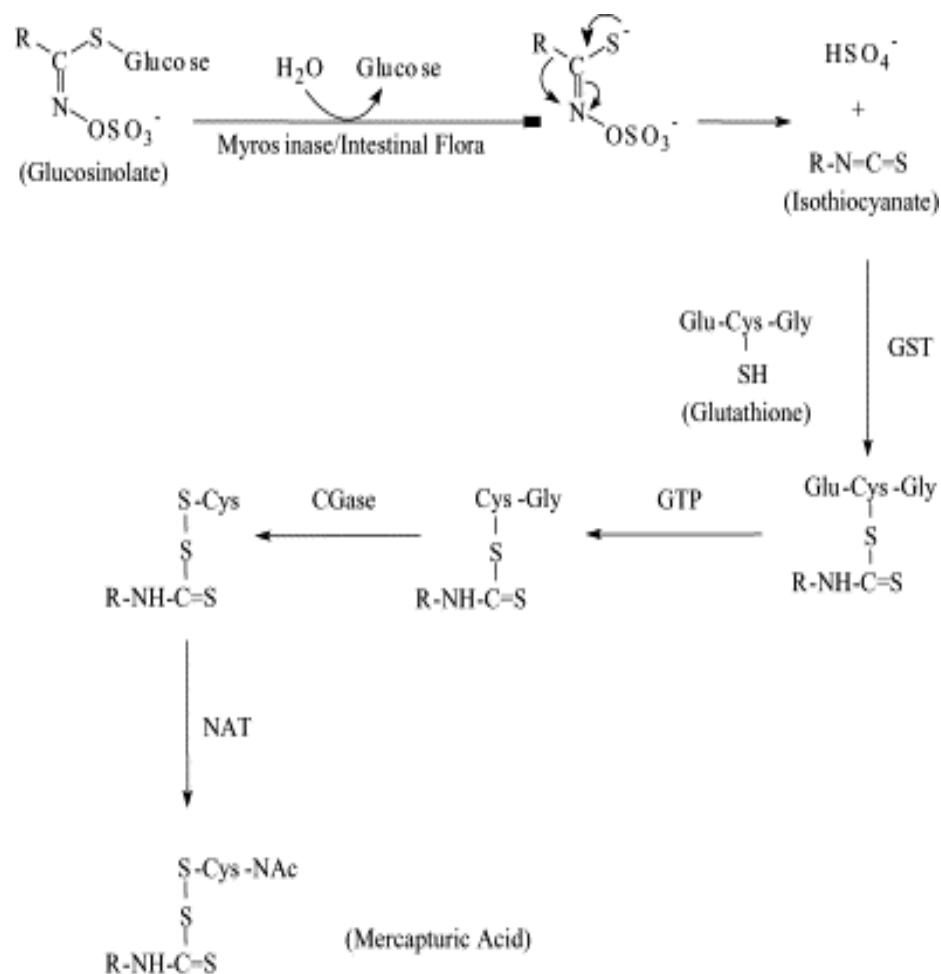


Figura 3.3: Sintesi e metabolismo degli ITC. I glucosinolati sono convertiti a ITC dall'azione dell'enzima mirosinasi che si trova nelle piante o nella flora intestinale. Gli ITC formati vengono coniugati con il glutathione dall'enzima glutathione S-transferasi (GST), quindi metabolizzati tramite una serie di reazioni catalizzate dagli enzimi γ -glutamilttransferasi (GTP), cisteinilglicinasi (CGase), e N-acetiltransferasi (NAT). Questa serie di reazioni conduce alla formazione di acido mercapturico che viene escreto con le urine. Per il sulforafano il gruppo R è $\text{CH}_3\text{SO}(\text{CH}_2)_4-$ e il suo precursore nelle piante è chiamato glucorafanina (Keum et al. 2004).

3.4 Attività biologiche

Molti studi dimostrano che un largo consumo di *Brassicaceae* è correlato con una diminuzione del rischio di cancro; questo è più evidente a livello di stomaco, polmone, colon e retto e meno per il cancro prostatico, endometriale e ovarico (*van Poppel et al. 1999*).

Tra i prodotti di idrolisi dei GLS, SF è sicuramente uno di quelli con maggiore attività biologica.

3.4.1 Effetti chemiopreventivi

Il National Cancer Institute USA ha inserito SF nella lista dei 40 più promettenti anticancerogeni (*Kelloff et al. 2000*). L'effetto chemiopreventivo di SF è probabilmente determinato da molteplici meccanismi, i quali interagiscono assieme per ridurre il rischio di cancerogenesi. Tali meccanismi comprendono la modulazione del potenziale antiossidante, l'inibizione degli enzimi di fase I e l'induzione degli enzimi di fase II, l'inibizione degli addotti con il DNA, l'induzione dell'apoptosi, proprietà antinfiammatorie, l'inibizione dell'angiogenesi e metastasi, la modificazione degli istoni, e la rottura dei microtubuli.

L'angiogenesi è il processo di formazione di nuovi vasi sanguigni attraverso cui la massa tumorale in crescita si assicura il nutrimento. Senza questa nuova formazione di vasi in grado di creare e sviluppare una rete di capillari intratumorali, la crescita della massa è limitata a soli circa 0.5 mm di diametro, ovvero lo spessore massimo attraverso cui riescono a diffondere l'ossigeno e i nutrienti. La progressione dell'angiogenesi neoplastica richiede la presenza di alcune molecole proangiogeniche rilasciate dalle cellule tumorali, come il fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF). SF ha mostrato effetti inibitori sull'espressione di RNA di VEGF e di altri fattori trascrizionali associati all'angiogenesi, ha inoltre mostrato di inibire l'angiogenesi attraverso la soppressione della proliferazione in cellule endoteliali di aorta di bovino, e un effetto simile è stato osservato nelle cellule endoteliali della vena ombelicale dell'uomo. Nell'insieme questi risultati indicano che SF agisce sia in vitro sia in vivo sulla popolazione cellulare endoteliale, interagendo con tutti gli stadi essenziali della neovascolarizzazione, dal segnale di proangiogenesi alla proliferazione e migrazione di cellule endoteliali, nonché alla formazione di vasi sanguigni.

Un altro meccanismo attraverso il quale SF è in grado di incidere sul processo cancerogeno, è la modificazione dell'acetilazione delle proteine

istoniche, processo altamente dinamico che esercita un profondo controllo sull'espressione genica. Gli istoni deacetilati (HDAC) rappresentano uno dei target più promettenti per lo sviluppo di farmaci antitumorali, in quanto risultano sovraespressi in numerose cellule e tessuti tumorali (*Kim et al. 2003*). Il trattamento con SF di diversi tipi cellulari ha evidenziato una diminuzione dell'attività istone deacetilasi e un aumento degli istoni acetilati H3 e H4 (*Myzak et al. 2004*). L'inibizione della deacetilazione istonica è stata attribuita ai metaboliti di SF, SF-cisteina e SF-N-acetilcisteina (SF-NAC). SF è inoltre in grado di arrestare il ciclo cellulare attraverso l'inibizione della polimerizzazione della tubulina, con conseguente rottura dei microtubuli (*Jackson et al., 2004*).

3.4.2 Modulazione degli enzimi di fase I e II

Tutti i composti presenti nell'ambiente o introdotti con la dieta vengono sottoposti a biotrasformazione una volta entrati nell'organismo umano.

Le reazioni di biotrasformazione sono di due tipi: reazioni di fase I e di fase II. Le prime comprendono ossidazioni, riduzioni ed idrolisi e sono dette "di funzionalizzazione" in quanto il loro scopo è di inserire, a livello del substrato, gruppi funzionali di legame (-COOH, -SH, -OH) che permettano le reazioni di fase II. Le reazioni di fase I rendono i substrati più idrofili e sono catalizzate dal sistema ossidasico a funzione mista localizzato a livello del reticolo endoplasmatico delle cellule epatiche. Questa famiglia di enzimi è costituita principalmente dal citocromo P450 (CYP). Gli enzimi di fase I possono essere responsabili della formazione di composti cancerogeni, in quanto possono trasformare molecole precancerogene in intermedi altamente reattivi che possono legare macromolecole critiche come DNA, RNA e proteine.

Nei roditori, numerosi studi hanno dimostrato che SF può inibire la formazione di addotti al DNA e contrastare i composti cancerogeni variando il livello di alcune isoforme di CYP, sia tramite meccanismi competitivi, sia con modificazioni covalenti dirette (*Zhang et al. 1994*). Negli epatociti di ratto, SF è stato in grado di diminuire l'attività enzimatica di CYP1A1 e 2B1/2 con meccanismo dose-dipendente (*Maheo et al. 1997*). Nei microsomi epatici di ratti trattati con acetone ha inibito in modo competitivo CYP2E1 e la genotossicità indotta da N-nitrosodimetilammina (NDMA) (*Barcelo et al. 1996*). Alle concentrazioni di 0.064-20 μM SF ha inibito la sintesi del DNA indotta dall'NDMA (33.5 μM) con meccanismo dose-dipendente. Inoltre, SF (0.1-10 μM), mediante l'azione su CYP2E1, ha prodotto una marcata riduzione della rottura del

filamento del DNA, causata da cancerogeni quali NDMA e 2-ammino-3-metilimidazo[4,5-*f*]crinolina (IQ) (*Barcelo et al. 1998*).

Negli epatociti umani SF ha diminuito l'espressione di CYP3A4, un'isoforma predominante nel fegato, sia a livello di mRNA, sia come attività enzimatica (*Maheo et al. 1997*).

Alle dosi di assunzione dietetica, SF ha diminuito i livelli di apoproteina CYP2B, mentre a dosi più elevate anche quelli di apoproteina CYP3A2 (*Yoxall et al. 2005*).

La capacità di SF di inibire gli enzimi di fase I è legata a quella di contrastare la formazione di addotti al DNA causata da composti cancerogeni. Studi in vitro hanno indicato SF come un potente inibitore della mutagenesi indotta dalle ammine eterocicliche (HCA) (*Shishu et al. 2003*). L'esposizione a HCA, derivante dalla cottura della carne, è stata implicata nell'eziologia di alcuni tumori, come quello al seno, al colon ed alla prostata. Il trattamento con SF (1-10 µM) ha significativamente ridotto il livello di addotti al DNA formati dalla 2-ammino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-*b*]piridina, il tipo di HCA più abbondante negli epatociti e nelle cellule umane HepG2, in modo dose-dipendente.

Nella linea MCF-10F di cellule epiteliali di ghiandola mammaria, SF ha inibito la formazione di addotti successivi ad esposizione a Benzo[*a*]pirene (BaP) e 1,6-dinitropirene. Il pretrattamento per 24 ore con SF prima dell'esposizione a BaP ha ridotto a meno del 20% il numero delle rotture del filamento del DNA prodotta dal cancerogeno (*Bonnesen et al. 2001*). SF, a dosi non tossiche, è risultato inefficace nell'indurre CYP1A1 nelle cellule LS-174, ma ha fornito protezione inducendo gli enzimi di fase II. Questi dati forniscono evidenza di come SF sia in grado di proteggere il DNA dai danni causati dagli agenti cancerogeni in vitro, tramite l'inibizione di alcuni enzimi di fase II, sebbene la correlazione tra i due meccanismi non sia sempre chiaramente dimostrata.

Le reazioni catalizzate dagli enzimi di fase II sono reazioni di coniugazione che generalmente aumentano la solubilità in acqua dei composti, favorendo così la loro escrezione per via renale. Dato che tali enzimi facilitano l'escrezione dei composti dall'organismo, sono anche chiamati enzimi detossificanti. SF è uno dei più potenti induttori conosciuti di tali enzimi. I geni che codificano per questi enzimi contengono una specifica sequenza di DNA, chiamata antioxidant responsive element (ARE). È stato dimostrato che gli ITC aumentano l'attività degli enzimi di fase II incrementando la trascrizione di geni che contengono la sequenza ARE (*Dinkova-Kostova 2002*). I geni che contengono questa sequenza di enhancer sono regolati dal fattore di trascrizione Nrf2. Nrf2 si trova nel citoplasma legato alla proteina citoscheletrica Keap1. In seguito ad

alterazione dello stato redox citosolico, si rompe il legame tra Keap1 e Nrf2, quest'ultimo viene così attivato e, libero dal legame con la proteina, può essere traslocato al nucleo dove induce la trascrizione dei geni che presentano la sequenza ARE. Molti studi dimostrano che tale via metabolica è implicata nella protezione cellulare da stress ossidativo e che può costituire un efficace bersaglio terapeutico nei disordini cronici quali cancro e patologie neurodegenerative (*Lee et al. 2004*). SF e gli ITC in generale sono considerati antiossidanti indiretti, in quanto sono in grado di proteggere le cellule dalla eccessiva produzione di radicali liberi, non agendo da donatori o accettori di elettroni, ma andando a modulare l'espressione degli enzimi di fase II e modificando i livelli intracellulari di GSH. Gli ITC nella cellula sono coniugati con GSH e questo porta ad una diminuzione del pool intracellulare di tale composto, che viene compensata dall'attivazione della γ -glutamylcisteina sintasi, l'enzima limitante nella sintesi del GSH (*Mulcahy et al. 1997*).

3.4.3 Induzione di apoptosi

La morte cellulare programmata od apoptosi è un processo finemente regolato che avviene in conseguenza di una serie di condizioni fisiologiche e patologiche, come parte del ciclo cellulare. L'apoptosi svolge un ruolo fondamentale nella fisiologia e nello sviluppo cellulare, così come nel mantenimento dell'omeostasi e nell'eliminazione di cellule danneggiate o non più necessarie per l'organismo. Un'alterazione nella regolazione del processo apoptotico può contribuire direttamente alla patogenesi di alcune malattie, come disordini del sistema immunitario, degenerazione neuronale e tumori.

A differenza della necrosi, durante la quale la cellula subisce un insulto maggiore che causa perdita dell'integrità della membrana e liberazione del contenuto cellulare nello spazio circostante, la morte di tipo apoptotico è contraddistinta da precise e progressive modificazioni morfologiche, che portano ad un'eliminazione "pulita" dei componenti cellulari e senza innesco di un processo flogistico, come tipicamente avviene nella necrosi.

L'apoptosi è indotta da numerosi stimoli, inclusi composti genotossici e vari processi ossidativi, che attivano le caspasi, una famiglia di cisteina-proteasi, responsabili dell'iniziazione e dell'esecuzione dell'apoptosi stessa. Questi enzimi sono utilizzati comunemente sia per valutare se l'apoptosi è indotta in differenti sistemi sperimentali, sia per stabilire marcatori precoci o tardivi di apoptosi, a seconda di quale caspasi

è esaminata (*Degterev et al. 2003*). L'azione delle caspasi, sintetizzate come proenzimi inattivi e attivate per eliminazione di specifici residui di aspartato, ha come risultato finale la scissione e l'inibizione di proteine cellulari chiave, come la poli(-ADP-ribosio)polimerasi (PARP), enzima riparatore del DNA (*Degterev et al. 2003*). L'apoptosi può essere anche indotta attraverso una via caspasi-indipendente, mediante il rilascio di fattori proteici inducenti apoptosi (AIF) nel citosol o con l'attivazione delle calpaine, proteasi citosoliche calcio-dipendenti (*Broker et al. 2005*).

La prima evidenza dell'effetto citostatico ad opera di SF è stata rilevata nelle cellule tumorali del colon umano (*Gamet-Payraastre et al. 1998*). Il trattamento con SF 15 e 50 μM ha ridotto la vitalità rispettivamente nelle cellule HT29 e Caco-2. In seguito, in cellule tumorali murine di colon (*Gamet-Payraastre et al. 1998*), prostata (*Singh et al. 2004; Choi et al. 2007*), midollo (*Gingras et al. 2004*) e ghiandola mammaria (*Jackson et al. 2004*), è stata evidenziata la capacità di SF di indurre gli eventi caratteristici dell'apoptosi, quali la condensazione cromatinica, la traslocazione della fosfatidilserina attraverso la membrana plasmatica e la frammentazione del DNA.

Capitolo 4 Induzione degli enzimi di fase 2

L'antioxidant responsive element (ARE) è una sequenza di enhancer *cis*-agente che media l'attivazione trascrizionale dei geni delle cellule esposte a stress ossidativo (*Rushmore et al., 1991*).

Il termine "stress ossidativo" comprende una varietà di condizioni che provocano un cambiamento dello stato redox cellulare quali, ad esempio, l'aumento della produzione di specie radicaliche e la presenza di xenobiotici, ad azione pro-ossidante, contenenti gruppi reattivi che mimano un insulto ossidativo. In risposta a ciò, i geni che presentano la sequenza ARE codificano proteine che aiutano sia a controllare lo stato redox cellulare, sia a proteggere le cellule dal danno ossidativo (*Hayes et al., 1999*).

Le proteine codificate dai geni che possiedono ARE tra le sequenze di enhancer includono una serie di enzimi associati alla biosintesi del glutatione (*Wild et al., 1998*), proteine redox provviste di gruppi sulfidrilici (*Ishii et al., 2000*) ed enzimi del metabolismo dei farmaci (*McMahon et al., 2001*).

La prima evidenza dell'esistenza di una via metabolica mediata da ARE per la regolazione genica è stata che alcuni xenobiotici sono in grado di modulare l'attività degli enzimi di fase 1 e 2, coinvolti nel metabolismo dei farmaci (*Prochaska et al., 1985*).

Il CYP1A1, enzima di fase 1, viene indotto nelle cellule in seguito ad esposizione a sostanze endogene o xenobiotiche che risultino ligandi per il recettore arilidrocarburo (AhR) (*Whitlock, 1999*).

Questa via ben caratterizzata coinvolge il complesso AhR-ligando, il quale dimerizza con la proteina AhR-nuclear translocator (ARNT), per poi legarsi ad una regione di enhancer del DNA conosciuta come xenobiotic responsive element (XRE) (*Swanson et al., 1995*). Alcuni ligandi AhR sono anche in grado di indurre enzimi di fase 2 come la glutatione S-transferasi (GST) e la NAD(P)H:chinone ossidoreduttasi (NQO1) (*Favreau et al., 1991*).

I composti che inducono enzimi di fase 1 e di fase 2 sono considerati induttori bifunzionali, mentre quelli che regolano l'espressione dei soli enzimi di fase 2 sono detti induttori monofunzionali (*Prochaska et al., 1988*).

Affinché gli induttori bifunzionali siano in grado di aumentare l'espressione degli enzimi di fase 2, devono venire metabolizzati dalle monoossigenasi (enzimi di fase 1) a composti chimicamente

simili agli induttori monofunzionali. Tutto ciò è facilitato dalla loro capacità di indurre il CYP1A1, con l'effetto di aumentare il loro stesso metabolismo (*Rushmore et al., 1990*).

Alcuni studi hanno anche dimostrato l'esistenza di una distinta via di induzione degli enzimi di fase 2, indipendente dal sistema che coinvolge AhR.

Studi successivi hanno scoperto l'esistenza di un nuovo elemento *cis*-agente all'interno della regione che fiancheggia il lato 5' del gene GSTA2 di ratto che risponde al β -naftoflavone (β -NF), un induttore bifunzionale, in presenza di un AhR attivo (*Telakowski-Hopkins et al., 1988*).

L'analisi dei promoter ha mostrato che la sequenza di DNA di questa porzione regolatoria di 41-bp è diversa da XRE; questa unica regione enhancer è stata più tardi chiamata ARE, in quanto non solo reattiva nei confronti di β -NF, ma anche nei confronti di antiossidanti fenolici (*Rushmore et al., 1990*).

Si può quindi affermare che ARE è in grado di mediare risposte trascrizionali in seguito all'esposizione ad una grande varietà di molecole strutturalmente diverse (Figura 4.1). Il core della sequenza di DNA, essenziale perché si verifichi la risposta in seguito a tali stimoli, è stato determinato attraverso analisi mutazionali e di delezione: la sequenza è definita come 5'-TGACnnnGC-3' (*Rushmore et al., 1991*).

Successivamente sono stati identificati altri geni indotti da agenti mono e bifunzionali che possiedono tale promotore, tra cui il gene della subunità GSTA1 di topo (*Friling et al., 1990*) e i geni NQO1 umani e di ratto.

I paragrafi successivi focalizzeranno l'attenzione fondamentale sugli enzimi di fase 2, descrivendo dettagliatamente i processi alla base del meccanismo di attivazione.

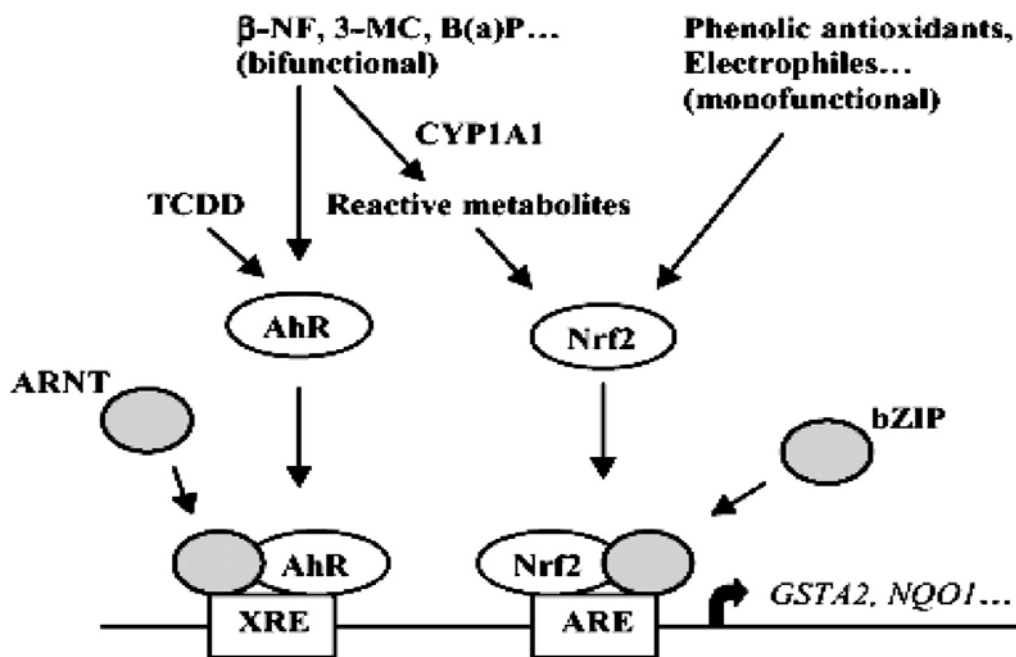


Figura 4.1: regolazione trascrizionale dei geni di ratto *GSTA2* ed *NQO1* data da induttori mono e bifunzionali. Induttori bifunzionali e TCDD attivano AhR il quale trasloca al nucleo e si associa ad ARNT per attivare la trascrizione attraverso XRE. Gli induttori bifunzionali possono attivare la trascrizione anche attraverso ARE grazie ad un meccanismo separato dal precedente che prevede la loro trasformazione in metaboliti attivi con le caratteristiche degli induttori monofunzionali. Tali induttori possono agire solo attraverso il meccanismo mediato da ARE. 3-MC, 3-metilcloroantere, B(a)P, benzo(a)pirene, TCDD, 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-diossina.

4.1 *Enzimi detossificanti di fase 2*

4.1.1 *Glutazione ed enzimi ad esso correlati*

Alcuni tra i più importanti sistemi antiossidanti endogeni sono rappresentati dal tripeptide GSH e da piccole proteine, come la tioredoxina, la glutaredoxina e la perossiredoxina, che hanno la peculiarità di contenere nella loro struttura dei gruppi tiolici. Tra tutte queste molecole il glutatione si trova ubiquitariamente e in concentrazione millimolare all'interno della cellula e apporta il contributo maggiore nel mantenimento dello stato redox ottimale.

Il GSH esiste sia nella forma ridotta, il GSH, sia in quella ossidata, il GSSG, e partecipa alle reazioni redox attraverso l'ossidazione dei gruppi tiolici. Nelle normali condizioni redox cellulari la molecola si trova principalmente nella forma ridotta ed è distribuita soprattutto nel nucleo, nel reticolo endoplasmatico e nei mitocondri; è possibile anche una forma legata covalentemente a proteine, attraverso un processo detto glutationilazione (*Huang et al., 2002*), grazie al quale può agire come cofattore enzimatico in meccanismi di difesa cellulare (*Pompella et al., 2003*).

Il GSH può agire direttamente nei confronti dei radicali liberi oppure può funzionare da substrato durante la detossificazione di acqua ossigenata, idroperossidi lipidici e composti elettrofili.

Il glutatione è sintetizzato enzimaticamente dalla gamma-glutamylcisteina sintetasi (γ GCS), l'enzima chiave (*Lu, 1998*), attraverso due reazioni ATP dipendenti, e dalla glutatione sintetasi. Altri fattori importanti nella sintesi ex novo del GSH sono la disponibilità di cisteina (amminoacido fondamentale della molecola) e la stessa concentrazione di GSH che inibisce, attraverso un meccanismo a feed-back, l'attività della γ GCS.

In presenza di stress ossidativo la concentrazione di GSH diminuisce rapidamente, mentre quella di GSSG, potenzialmente citotossico, aumenta, a causa della avvenuta riduzione dei perossidi, oppure come risultato dell'eliminazione di radicali liberi. Queste variazioni del rapporto GSH/GSSG hanno due importanti conseguenze: lo stato redox dei tioli cellulari si modifica, attivando alcune risposte trascrizionali antiossidanti; poiché GSSG viene degradato preferenzialmente all'esterno della cellula, aumenta la richiesta intracellulare di sintesi ex novo di GSH.

Il meccanismo che si contrappone al danno ossidativo coinvolge la transattivazione di geni codificanti enzimi che partecipano alla sintesi ed al metabolismo del glutatione. Nella stragrande maggioranza dei casi tali enzimi appartengono alla famiglia degli enzimi detossificanti di fase 1 e 2 e sono rappresentati dalla glutatione perossidasi (GPx), dalla GST e dalla glutatione reduttasi (GR).

Le GPx costituiscono una famiglia di enzimi tessuto-specifici (*Ursini et al., 1995*) capaci di ridurre molteplici idroperossidi organici ed inorganici ai corrispondenti composti idrossilati, utilizzando GSH e/o altri equivalenti riducenti.

Sono tutte proteine contenenti selenio, il quale, durante il ciclo catalitico, è ossidato dall'idroperossido ad acido selenico, un intermedio che viene successivamente ridotto da un donatore di elettroni.

Quando l'enzima utilizza il GSH, si forma un ponte selenio-disolfuro che viene rotto da un'altra molecola di GSH per rigenerare la GPx ridotta.

Durante la catalisi, lo stato ossidativo dell'enzima dipende dalle concentrazioni relative del riducente, il GSH, e del substrato ossidato, l'idroperossido. Le glutatione perossidasi sono ubiquitarie.

Ad esempio, nel tratto gastrointestinale l'isoenzima forma una barriera nei confronti degli idroperossidi derivati dalla dieta o dal metabolismo di xenobiotici tossici. La GPx dei fosfolipidi sembra essere coinvolta nella protezione delle biomembrane contro il danno ossidativo.

In generale questi isoenzimi possono ricoprire un ruolo nel controllo dello stato redox di determinati distretti dell'organismo; in particolare rientrano nella regolazione della concentrazione di idroperossidi e nell'evocazione di risposte cellulari quali la morte programmata, la proliferazione, la produzione di citochine e così via (*Nakashima et al., 2005*).

Le GST comprendono tre famiglie di enzimi: possono essere citosoliche, mitocondriali e microsomiali, e sono in grado di detossificare gli xenobiotici elettrofili nocivi, quali cancerogeni chimici e inquinanti ambientali. Inoltre, rappresentano una protezione anche verso composti reattivi prodotti in vivo durante lo stress ossidativo dovuto ad esposizione a sostanze inquinanti, ingestione di componenti della combustione degli alimenti o

contaminati da micotossine; agiscono inattivando aldeidi endogene insature, chinoni, epossidi e idroperossidi (*Hayes et al., 2005*).

Le GST esplicano queste funzioni protettive perchè sono in grado di catalizzare la coniugazione del GSH con i prodotti finali dell'ossidazione, rappresentano perciò una seconda linea difensiva contro l'ampia varietà di sostanze tossiche prodotte nelle reazioni mediate dalle ROS.

Va evidenziato però che le attività di GPx e GST possono diminuire i livelli di GSH intracellulare, infatti, durante la reazione catalizzata dalla GPx, l'esagerata produzione di GSSG può condurre ad un eccessivo rilascio di questa molecola per mantenere il rapporto GSH/GSSG, perdendo così la possibilità di rigenerarlo dentro la cellula. Lo stesso accade durante le reazioni mediate dalle GST: in questo caso il GSH viene coniugato con le molecole dannose generando prodotti che sono rapidamente eliminati dalla cellula con conseguente deplezione del GSH cellulare.

La GR è in grado di ridurre il GSSG a GSH utilizzando il NADPH come agente riducente (*Argyrou et al., 2004*); è un flavoenzima codificato, nell'uomo, da un singolo gene.

È stato osservato che l'esposizione ad agenti che provocano un aumento dello stress ossidativo produce anche uno stimolo positivo nella trascrizione degli mRNA contenenti l'informazione per la sintesi dell'enzima. È stato inoltre dimostrato che l'attività enzimatica è regolata in risposta allo stress e che mutazioni a carico della funzionalità di GR hanno effetti deleteri.

Si può quindi affermare che la ricostituzione di GSH è un passaggio fondamentale nel metabolismo delle reazioni GSH-dipendenti (*Rogers et al., 2004*). In figura 4.2 sono rappresentate le relazioni funzionali esistenti tra il glutatione e gli enzimi ad esso correlati.

La presenza di GSH è importante per la funzionalità degli enzimi da esso dipendenti che partecipano ai meccanismi di difesa cellulari, ma non è, da sola, sufficiente a prevenire la citotossicità delle ROS.

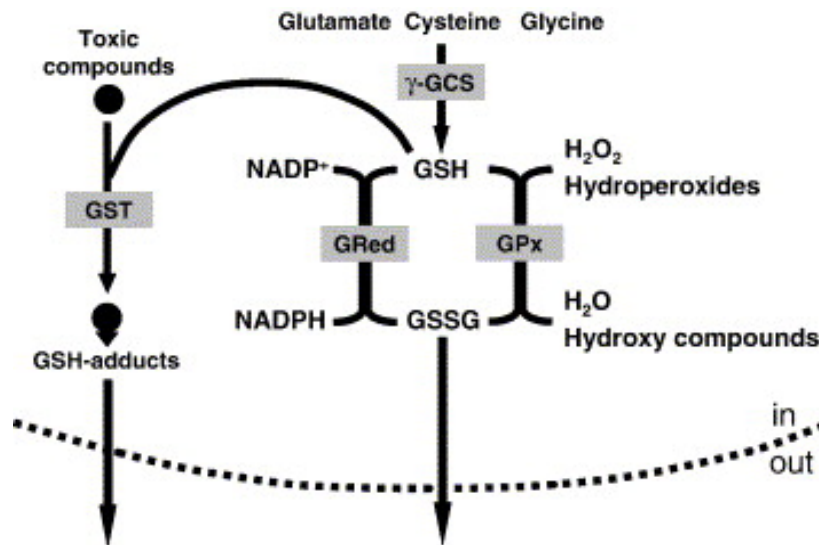


Figura 4.2: glutatione ed enzimi ad esso correlati: il glutatione può agire direttamente come scavenger di radicali liberi, oppure fungere da substrato per la glutatione perossidasi e la glutatione S-transferasi durante la detossificazione del perossido di idrogeno, dei lipidi idroperossidi e dei composti elettrofili. Durante le reazioni GST mediate, il GSH viene coniugato a diversi elettrofili, e gli addotti così formati vengono escreti dalla cellula. La produzione di GSSG attraverso la glutatione perossidasi può portare alla formazione di disolfuri misti, al rilascio del GSSG in eccesso per mantenere il rapporto GSH/GSSG, oppure alla riduzione a GSH attraverso la glutatione reduttasi utilizzando NADPH come agente riducente. La risultante deplezione del GSH cellulare può venire rimpiazzata da una sintesi ex novo attraverso due reazioni ATP dipendenti grazie alla γ GCS e alla glutatione sintetasi.

4.1.2 La tioredoxina reduttasi 1

Il complesso della tioredoxina comprende la tioredoxina (Trx), la tioredoxina reduttasi (TR), NADPH e la tioredoxina perossidasi (TP). Trx è una piccola proteina con un peso molecolare di circa 12 kDa, caratterizzata da un ditiolo reattivo e da una sequenza conservata (Trp-Cys-Gly-Pro-Cys) (Holmgren, 1985).

La forma ridotta della Trx è una proteina contenente un gruppo disolfuro con capacità ossidoriduttive marcate, che agisce riducendo i disolfuri e ossidando le cisteine presenti nelle proteine. A sua volta la Trx ossidata viene ridotta da NADPH e da TR. TP riduce H₂O₂ ad acqua ed ossigeno molecolare grazie ai due elettroni forniti da Trx (Wood et al., 2003). TP sembra svolgere

numerose funzioni, da antiossidante a regolatore dei segnali di traduzione.

I complessi di Trx e GSH sono sistemi redox paralleli e non sono accoppiati all'interno delle cellule. Tuttavia questi due sistemi sembrano condividere alcune funzioni. La diversa specificità di substrato e le proprietà caratteristiche di ciascuno dei due sistemi suggeriscono che essi possano contribuire in maniera sinergica a mantenere l'omeostasi redox cellulare (*Aslund et al., 1999*).

Trx possiede attività intra ed extra cellulari. All'interno della cellula regola le interazioni proteine-acidi nucleici, svolge azione protettiva verso le ROS, interagisce con le proteine e regola le attività enzimatiche.

L'espressione della Trx viene indotta nelle cellule in risposta ad una ampia varietà di stimoli tra cui il perossido di idrogeno, le radiazioni ultraviolette, i raggi X, le infezioni virali e le mutazioni genetiche (*Tomimoto et al., 1993*).

D'altra parte Trx viene rapidamente secreta o rilasciata da diversi tipi di cellule, tra cui cellule transfettate con il plasmide contenente il gene Trx (*Powis et al., 1994*). Lo stress ossidativo può promuovere la secrezione di Trx (*Rubartelli et al., 1992*).

La Trx extracellulare ha un ruolo nella stimolazione della crescita cellulare (*Gasdaska et al., 1995*) e nella regolazione delle citochine (*Newman et al., 1994; Bertini et al., 1999*).

Sebbene il meccanismo attraverso il quale la Trx extracellulare agisce sia stato ampiamente studiato, molte delle proprietà dell'enzima non sono ancora totalmente definite. È noto che la stessa Trx resiste all'ossidazione ed è stata perciò ampiamente utilizzata per ridurre lo stress ossidativo in cellule epiteliali; Trx può rappresentare un messaggero per l'induzione di numerosi segnali di trasduzione, inclusi quelli necessari agli antiossidanti per combattere lo stress ossidativo.

4.1.3 La NADP(H): chinone ossidoreduttasi 1

La NQO1 è una flavoproteina che esiste come dimero, le cui subunità hanno peso molecolare pari a 32,000 kDa; è generalmente associata ad un gruppo FAD legato non covalentemente. Si ritrova prevalentemente nel citosol (90%) (*Eliasson et al., 1999*), sebbene siano state individuate isoforme anche nel reticolo endoplasmatico,

nei mitocondri, nell'apparato del Golgi (*Edlund et al., 1982*) e nel nucleo (*Winski et al., 2002*).

Questo enzima è una reduttasi che utilizza obbligatoriamente due elettroni nelle sue reazioni. Ciò è in contrasto con il meccanismo di altre reduttasi come la NADH:citocromo b reduttasi, la NADPH:citocromo P450 e la xantina ossidasi, che utilizzano invece un solo elettrone. Il meccanismo cinetico è definito a “ping-pong” e utilizza i cofattori NADH e NADPH indifferentemente (*Siegel et al., 1990*).

Come suggerisce il nome dell'enzima, i chinoni sono un gruppo di substrati molto comuni e vengono ridotti grazie ad un meccanismo di trasferimento di ioni idruro per generare il corrispondente derivato idrochinonico.

A causa dei numerosi effetti deleteri dei composti chinonici, inclusa la capacità di arilare i nucleofili e generare specie reattive dell'ossigeno attraverso meccanismi redox ciclici, la rimozione di un chinone da un sistema biologico attraverso la NQO1 viene considerata reazione di detossificazione (*Lind et al., 1982; Di Monte et al., 1984*). Tuttavia la riduzione attraverso due elettroni di alcuni chinoni antitumorali come mitomicina C, E09, streptonigrina e β -lapachone attraverso NQO1, produce metaboliti di tossicità superiore rispetto ai composti di partenza (*Beall et al., 1996; Pink et al., 2000*). Poiché la NQO1 è contenuta ad elevate concentrazioni in tutte le cellule di tumore solido umano (*Siegel et al., 2000*), si è pensato di utilizzare i composti bioattivati dalla stessa NQO1 nella terapia di tali tumori (*Winski et al., 2001*).

4.1.4 Detossificazione dei chinoni attraverso la riduzione a due elettroni

Un'ampia gamma di studi attesta il ruolo della NQO1 nei sistemi di detossificazione. L'induzione di questo enzima sembra proteggere dagli effetti citotossici, mutageni e cancerogeni di diversi composti (*Prochaska et al., 1987*).

Perché avvenga l'induzione di NQO1 sono necessari gli elementi XRE ed ARE contenuti nel promoter della stessa NQO1, i quali sono anche in grado di promuovere l'induzione di altri enzimi detossificanti.

Alcuni recenti studi effettuati utilizzando il t-butilidrochinone, una comune molecola che aumenta i livelli di NQO1, mostrano l'incremento dell'espressione di 63 differenti geni

attraverso l'uso della tecnologia dei microarray (*Li et al., 2002*). Tutto questo sottolinea il bisogno di mettere a punto studi specifici per definire il ruolo di un particolare gene nei meccanismi di detossificazione. In uno studio condotto a Stoccolma negli anni '80 due differenti gruppi di ricerca, utilizzando il naftochinone menadione (*Lind et al., 1982; Thor et al., 1982*), hanno definito il ruolo della NQO1 come enzima detossificante nel metabolismo dei chinoni. Sia l'arilazione menadione-indotta dei nucleofili cellulari, sia la formazione di specie reattive dell'ossigeno, diminuiscono in presenza di NQO1. In topi carenti di NQO1 è stata dimostrata la tossicità del menadione (*Radjendirane et al., 1998*) e un aumento di insorgenza di tumori della pelle indotti da benzo[a]pirene e 7,12-dimetilbenzantracene (*Long et al., 2001*).

Il ruolo della NQO1 nei meccanismi di detossificazione è correlato alla sua distribuzione nei sistemi biologici, infatti nei topi, nei ratti e anche negli uomini si ritrova principalmente nei tessuti epiteliali ed endoteliali (*Siegel et al., 2000*), il che facilita l'interazione dei composti introdotti nell'organismo con la NQO1.

4.1.5 NQO1 come enzima antiossidante: ruolo nel metabolismo dell'ubichinone e della vitamina E

Oltre ad essere in grado di attivare e disattivare i composti esogeni, NQO1 ha un ruolo anche nel metabolismo di chinoni endogeni quali l'ubichinone e la vitamina E. Questi chinoni possiedono una grande porzione idrofobica e, nel loro stato ridotto, proteggono le membrane cellulari dalla perossidazione lipidica. La riduzione dell'ubichinone ad opera della NQO1 rigenera l'ubichinolo, il quale possiede potenti proprietà antiossidanti (*Landi et al., 1997*). Il chinone vitamina E si forma durante l'attacco del radicale libero alla vitamina E ed è sottoposto alla riduzione da parte di NQO1 per generare l'idrochinone (*Siegel et al., 1997*). Poiché il chinone vitamina E è privo di attività antiossidante, NQO1 può generare l'idrochinone corrispondente, un composto con proprietà antiossidanti superiori alla vitamina E.

4.2 Induzione enzimatica ARE-mediata

ARE può essere attivato da un'ampia gamma di molecole strutturalmente diverse, tra cui composti planari come i flavonoidi e gli antiossidanti fenolici (*Rushmore et al., 1991*), composti contenenti gruppi tiolici come gli isotiocianati (*Bonnesen et al., 2001*) e gli 1,2-ditiol-3-tioni (*Kwak et al., 2001*), e metalli pesanti (*Talalay et al., 1995*).

Gli induttori monofunzionali condividono alcune proprietà chimiche: sono composti elettrofili in grado di reagire con i gruppi sulfidrilici e di partecipare a reazioni di ossido-riduzione (*Dinkova-Kostova et al., 2002*). Gli induttori bifunzionali invece acquisiscono tali proprietà in seguito al metabolismo ossidativo. Composti come gli isotiocianati ed il dietilmaleato non necessitano di metabolismo e possono reagire direttamente con i gruppi SH, ossidare i residui di cisteina e consumare il GSH cellulare, mimando così un insulto ossidativo.

Per esempio, l'antiossidante fenolico butilidrossianisolo (BHA) viene metabolizzato a ter-butilidrochinone (tBHQ), il quale, solo dopo una reazione di dealchilazione, può partecipare a reazioni redox all'interno della cellula. In tal caso BHA agisce da pro-ossidante.

Un tipico induttore bifunzionale è β -NF, un flavonoide sintetico che, dopo metabolismo ad opera del CYP1A1 ad intermedio chinone, può partecipare nella cellula a cicli redox (*Rushmore et al., 1990*).

In correlazione alla natura dei composti che inducono la trascrizione ARE-mediata, numerose proteine, la cui espressione è sotto il controllo di ARE, possiedono un ruolo nella regolazione dello stato redox cellulare e nella protezione dal danno ossidativo. Enzimi come GST, NQO1 ed emeossigenasi 1 (HO-1) hanno lo scopo di detossificare la cellula dai prodotti secondari dello stress ossidativo, tra cui gli idroperossidi lipidici e quelli delle basi del DNA (*Bao et al., 1997*), i chinoni (*Talalay et al., 1982*) e le molecole contenenti gruppi eme (*Ryter et al., 2000*).

L'induzione degli enzimi coinvolti nella biosintesi del glutatione porta ad un aumento dei livelli di GSH cellulari, con conseguente diminuzione dei danni prodotti dagli insulti ossidativi (*Hayes et al., 1999*).

4.2.1 Antioxidant Responsive Element (ARE)

L'esistenza di induttori mono e bifunzionali (*Prochaska et al., 1985; Prochaska et al., 1988*) suggerisce l'ipotesi che l'espressione di diversi enzimi di fase 2 possa essere regolata attraverso un meccanismo distinto da quello mediato da AhR via XRE.

In seguito all'isolamento e alla caratterizzazione del gene codificante per la subunità GSTA2 di ratto (*Telakowski-Hopkins et al., 1988*), si è notata la formazione di un complesso in cui la sequenza regolatoria 5' era fusa con quella codificante l'enzima batterico cloramfenicolo acetil transferasi (*CAT*).

L'analisi di questo costrutto, in esperimenti di transfezione transiente, ha dimostrato che le cellule HepG2 contenenti il plasmide sopra citato presentano un aumento dell'attività di *CAT* quando vengono esposte a β -NF (*Telakowski-Hopkins et al., 1988*). Tali evidenze sottolineano il fatto che l'espressione di GSTA2 di ratto è regolata a livello trascrizionale in risposta agli xenobiotici.

Dal costrutto reporter iniziale sono stati creati dei mutanti di delezione, che sono stati testati tramite saggi di transfezione transiente, per determinare la sequenza cis-agente responsabile della risposta a β -NF; i risultati ottenuti hanno rivelato un nuovo elemento cis-agente distinto da XRE (*Rushmore et al., 1990*). Si è visto, inoltre, che cellule transfettate con costrutti reporter funzionanti sotto il controllo di questo nuovo elemento mostrano un aumento dell'induzione di *CAT* non solo in risposta a β -NF, ma anche all'antiossidante fenolico tBHQ, un composto che non elicitare risposte via XRE (*Rushmore et al., 1991*). Tale nuovo elemento, come già sottolineato in precedenza, è stato chiamato ARE. Contemporaneamente è stato scoperto un enhancer identico nella subunità GSTA1 di topo, l'ortologo del gene della subunità GSTA2 di ratto, definito come electrophile responsive element o EpRE (*Friling et al., 1990*).

Un'altra caratteristica di ARE, che la distingue da XRE, è la sua capacità di mediare la risposta a tBHQ in linee cellulari mutanti prive di AhR o di CYP1A1 (*Rushmore et al., 1990*).

Questi dati sono perciò una forte conferma dell'ipotesi che l'induzione degli enzimi di fase 2 possa essere mediata da un meccanismo AhR indipendente (*Prochaska et al., 1985; Prochaska et al., 1988*). Successive caratterizzazioni di ARE nel gene GSTA2

di ratto, effettuate attraverso analisi di mutazioni puntiformi, hanno portato all'identificazione di una sequenza 5'-TGACnnnGC-3', essenziale sia per l'attività basale sia per quella inducibile (*Rushmore et al., 1991*).

Oltre ai geni che codificano GSTA1 di ratto e GSTA2 di topo, ne sono stati identificati altri regolati da ARE, quali i geni che codificano per la proteina NQO1 di ratto ed umana (*Favreau et al., 1991; Jaiswal, 1991*), la subunità catalitica (γ -GCS_h) e regolatoria (γ -GCS_l) della γ -glutamilcisteina (*Moinova et al., 1998*) e HO-1 (*Inamdar et al., 1996*).

Grazie a ricerche effettuate su numerosi database, sono stati individuati una grande quantità di geni, inclusi quelli delle sulfotransferasi che, sebbene non ancora totalmente definiti, contengono sequenze simili ad ARE (*Johnsen et al., 1998*), sebbene non ancora funzionalmente caratterizzate.

Il fatto che i composti in grado di attivare ARE modifichino lo stato redox cellulare e la somiglianza tra ARE e il TPA-response element (TRE), fa supporre che ARE possa essere regolata dalle proteine della famiglia AP-1. Questi fattori di trascrizione sembrano attivare la trascrizione genica in seguito a numerosi segnali quali esteri del forbolo, fattori di crescita, radiazione U.V. e stress ossidativo (*Whitmarsh et al., 1996*); tuttavia, a dispetto della similitudine delle loro sequenze, ARE possiede caratteristiche che la differenziano da TRE. La differenza principale è la presenza di -GC- box dal lato 3' al termine del core della sequenza di ARE, aspetto critico per la sua inducibilità (*Favreau et al., 1995*).

Perciò, cellule transfettate con il costrutto ARE/TRE-CAT in cui le sequenze ARE sono state modificate a livello di nucleotidi non critici in modo che contengano un consensus motif TRE (5'-TGACAAAGC-3' a 5'-TGACTCAGC-3'), rispondono sia a tBHQ, sia al 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA).

La mutazione del box -GC- in questo costrutto comporta, invece, la perdita della risposta a tBHQ, anche se rimane invariata la sensibilità nei confronti dell'estere del forbolo. Successivamente si è visto che l'induzione di *CAT* nelle cellule HepG2, sottoposte a trattamento con tBHQ, si verifica solo in quelle transfettate con il complesso ARE-CAT, ma non con quello TRE-CAT (*Nguyen et al., 1994*).

Questi dati sono in accordo con quelli ottenuti da altri studi e suggeriscono che l'attivazione della trascrizione genica via ARE e

TRE sia mediata da diverse vie di trasduzione del segnale (*Yoshioka et al., 1995*). Va comunque notato che le sequenze ARE trovate in molti geni contengono al loro interno la sequenza TRE ed è possibile che tali geni siano sotto il controllo di entrambi gli enhancer. Studi in vitro hanno evidenziato alcuni fattori di trascrizione che sono in grado di legarsi ad ARE, in particolare Nrf1 e Nrf2 (NF-E2 related factor), membri della famiglia AP-1 e delle proteine Maf. Non deve perciò sorprendere come molte di queste proteine possano dimerizzare per generare complessi proteici in grado di legarsi in maniera specifica al DNA.

4.2.2 La via mediata da *keap1-Nrf2*

La trascrizione dei geni guidata da ARE è regolata, almeno in parte, dal fattore nucleare (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2), che normalmente è segregato nel citoplasma cellulare da Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1).

Quando le cellule sono esposte a stimoli come lo stress ossidativo o all'azione di alcuni agenti chemiopreventivi, Nrf2 si dissocia da Keap1, trasloca nel nucleo, si lega ad ARE ed attiva i geni antiossidanti e detossificanti di fase 2 (*Jeong et al., 2006*).

Sono stati proposti numerosi meccanismi per spiegare il controllo operato da Keap1 su Nrf2, come ad esempio la promozione di un legame tra filamenti citoplasmatici di actina e Nrf2, per impedirne il suo accesso al nucleo (*Kang et al., 2004*).

Recentemente è stata evidenziata la capacità di Keap1 di modulare i livelli di Nrf2, aumentando l'esportazione nucleare del fattore di trascrizione (*Velichkova et al., 2005*). Inoltre Keap1 regola la degradazione attiva di Nrf2, funzionando da adattatore per l'ubiquitinazione Cul-3 dipendente e per la degradazione di Nrf2 (*Eggler et al., 2005*). Keap1 può reprimere l'attività di Nrf2 muovendosi transitoriamente dentro e fuori dal nucleo per promuovere la sua ubiquitinazione (*Nguyen et al., 2005*).

Un modello largamente accettato per l'accumulo nucleare di Nrf2 è che la modificazione delle cisteine di Keap1 causi direttamente la dissociazione del complesso Keap1-Nrf2 (*Zhang et al., 2003*).

4.2.3 La proteina Nrf2

La proteina Nrf2 è stata isolata la prima volta grazie ad una procedura di clonazione utilizzando un oligonucleotide contenente nel DNA la sequenza NF-E2 come sonda (Moi *et al.*, 1994). NF-E2 è una proteina dimerica, coinvolta nell'espressione del gene della globulina nelle cellule ematopoietiche (Ney *et al.*, 1993).

La proteina NF-E2 attiva la trascrizione in seguito al legame con la sequenza 5'-TGCTGAGTCAC-3' sul DNA, formando un eterodimero con subunità di 45 e 18 kDa (Igarashi *et al.*, 1994). La subunità p45 è una proteina bZIP contenente il dominio di transattivazione nella regione N-terminale, mentre nella regione C-terminale vi è una sequenza con struttura leucine zipper (Ney *et al.*, 1993). La subunità p18 è stata identificata successivamente come appartenente alle proteine Maf, contenente la struttura di legame al DNA leucine zipper, ma priva del dominio di transattivazione. Mentre l'espressione della subunità p45 di NF-E2 è caratteristica dei tessuti ematopoietici (Ney *et al.*, 1993), altri due componenti della famiglia bZIP, quali Nrf1 e Nrf2, sono espressi ubiquitariamente in cellule e tessuti (McMahon *et al.*, 2001).

La distribuzione tissutale di queste proteine, combinata con la loro sequenza per il legame al DNA simile a quello di ARE, ha fatto ipotizzare che i geni collegati ad ARE siano regolati da Nrf1 e/o Nrf2. Il loro coinvolgimento è stato confermato in esperimenti in cui l'espressione di Nrf1 ed Nrf2 in cellule HepG2 aumentava l'attività di CAT, grazie ad un complesso ARE-CAT derivato dal gene umano NQO1, mentre non era in grado di indurre l'attività di CAT da un costrutto ARE-CAT mutante (Venugopal *et al.*, 1996).

Si dimostrò successivamente che Nrf2 è coinvolto nell'attivazione trascrizionale di altri geni collegati ad ARE, inclusi quelli di γ -GCS_h e γ -GCS_l umani (Wild *et al.*, 1999), HO-1 di topo (Alam *et al.*, 1999), e NQO1 e GSTA2 di ratto. In più, i dati ottenuti da studi in vivo hanno mostrato che l'induzione di tali enzimi (GSTA2 e NQO1) da parte di BHA, un induttore dell'attività di ARE, è fortemente attenuata nel topo privo dei geni interessati.

Tutto questo suggerisce che Nrf2 sia mediatore dell'attività basale e di quella inducibile di ARE; inoltre la perdita di Nrf2 comporta una profonda diminuzione dell'espressione e dell'attività di NQO1, di alcuni isoenzimi di GST e della subunità γ -GCS_h (McMahon *et al.*, 2001).

4.2.4 *Le proteine Maf*

Come prima menzionato, le proteine bZIP agiscono come dimero per potersi legare al DNA.

Ad oggi non ci sono evidenze che indichino se Nrf2 possa attivare l'espressione genica come omodimero o sia obbligato a formare eterodimeri.

Poiché p45 NF-E2, uno dei componenti di queste proteine, dimerizza con MafK per legarsi al DNA e attivare la trascrizione (*Igarashi et al., 1994*), si ipotizzò che le proteine Maf potessero rappresentare un partner di Nrf2 nell'attivazione dei meccanismi di trascrizione.

Sono conosciute tre proteine Maf: MafF, G, e K. Ognuna è costituita da una regione base di legame al DNA ed una leucine zipper, tuttavia non possiedono un dominio di transattivazione (*Motohashi et al., 1997*). Tali proteine possiedono inoltre un dominio "cap and collar" (CNC) omologo che sembra essere importante nel riconoscimento di motivi di legame simili ad AP-1 (*Kerppola et al., 1994*).

Le proteine Maf si ritrovano nel nucleo dove possono formare dimeri con tutti i membri della famiglia delle proteine CNC, incluso p45, NF-E2 (*Marini et al., 1997*), con le proteine BACH (*Oyake et al., 1996*) e alcuni dei fattori di trascrizione AP-1 (*Kataoka et al., 1995*). Il ruolo fisiologico di Maf in termini di regolazione di ARE resta ancora irrisolto.

I risultati di studi in vitro mostrano chiaramente che Nrf2 si lega al DNA con specificità solo in presenza di proteine Maf. Sebbene le proteine Maf facilitino il legame di Nrf2 alle sequenze bersaglio, questo non sembra aumentarne l'attività trascrizionale.

4.2.5 *Ruolo del sulforafane nella via mediata da Keap1-Nrf2*

SF è un potente induttore dell'accumulo nucleare di Nrf2 nelle cellule (*Jakubikova et al., 2006*). L'esposizione ad SF consente a Nrf2 di sottrarsi alla degradazione dipendente da Keap1, aumentando così la sua localizzazione nucleare e l'attivazione di geni Nrf2-dipendenti (*McMahon et al., 2003; Jeong et al., 2005*).

SF è un composto elettrofilo che può reagire con tioli proteici per formare addotti tionoacilici ed esibisce un pattern di modificazioni su Keap1 nettamente diverso dagli induttori di ARE, che agiscono mediante alchilazioni.

Il trattamento in vivo con SF non porta ad un accumulo di Keap1 ubiquinata (*Hong et al., 2005*) come è stato recentemente riportato in vitro (*Zhang et al., 2005*), suggerendo un nuovo meccanismo per la stabilizzazione di Nrf2 con la formazione di addotti tionoacilici tra Keap1 e SF (*Hong et al., 2005*).

Nonostante il modello in cui Keap1 lega Nrf2 sembri spiegare con successo la repressione e l'attivazione di Nrf2 in risposta al cambiamento delle condizioni redox, sono state riportate alcune considerazioni contrastanti. È stato dimostrato che la sola modificazione elettrofila di Keap1 non è sufficiente a rompere il complesso Keap1-Nrf2 (*Eggler et al., 2005*) e che tale complesso può essere perturbato attraverso la non-espressione di Keap1 mediante RNAi (*Devling et al., 2005*). Negli epatociti di topo la delezione del gene di Keap1 ha attivato Nrf2 e ne ha aumentato il suo accumulo nel nucleo portando ad una sovraespressione di molti enzimi di fase 2 (*Okawa et al., 2006*). Ciononostante studi successivi hanno chiarito che Nrf2 è in grado da solo di rilevare e trasdurre segnali ossidativi nel nucleo e di conseguenza di iniziare la trascrizione di geni che codificano per gli antiossidanti (*Li et al., 2006*). Tuttavia Keap1 può fornire un'ulteriore regolazione delle quantità di Nrf2 sia in condizioni basali che inducibili.

La via di trasduzione del segnale Nrf2-Keap1-ARE può essere modulata da molte chinasi a monte, incluse la fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3K), la proteina chinasi C e le proteine chinasi mitogeno-attivate (MAPKs). È stata scoperta di recente la capacità di SF di indurre geni regolati da Nrf2 con meccanismo PI3K-dipendente (*Jakubikova et al., 2005*).

Il ruolo chemiopreventivo di Nrf2 è sottolineato dall'aumentata suscettibilità ai composti cancerogeni e dalla perdita della capacità chemioprotettiva di SF che si verificano nei topi privi di Nrf2.

Nei topi ICR, SF ha ostacolato lo sviluppo di tumori provocati da BaP nella parte anteriore dello stomaco, mediante l'attivazione di enzimi antiossidanti e detossificanti di fase 2, ma tale protezione è risultata assente nei topi privi del gene codificante per Nrf2 (*Fahey et al., 2002*). Tali topi sono risultati

più sensibili allo sviluppo di tumori cutanei, suggerendo che gli effetti chemiopreventivi di SF in tale tessuto siano modulati e necessitino del fattore Nrf2 (*Xu et al., 2006*).

Inoltre topi con il gene Nrf2 non funzionante hanno manifestato minor capacità di indurre enzimi detossificanti, quali la GST e la NQO1 e maggiore suscettibilità all'azione di composti elettrofili citotossici (*McMahon et al., 2001*).

La somministrazione dietetica di semi di broccolo a topi Nrf2(+/-) e Nrf2 (-/-) ha incrementato l'attività di NQO1 e GST di circa 1.5 volte nel fegato, nello stomaco e nell'intestino di animali con fenotipo normale, ma non in quelli mutati.

La maggior attività transferasica è associata ad elevati livelli delle isoforme GSTA1/2, GSTA3 e GSTEM1/2. Gli estratti di semi di broccoli hanno significativamente aumentato anche i livelli degli enzimi GSTA3, GSTM1 e NQO1 nei fibroblasti embrionali dei topi Nrf(+/-) (*McWalter et al., 2004*), confermando ulteriormente che, sia in vivo che in vitro, l'azione antiossidante e detossificante di SF, attraverso l'induzione enzimatica, dipende dal fattore Nrf2.

A livello molecolare sono stati scoperti numerosi geni Nrf2-dipendenti che possono essere indotti da SF (*McWalter et al., 2004*). Analisi dei profili di espressione genica, che si sono avvalse della serie oligonucleotidica U74Av2 del genoma murino, hanno identificato 26 geni Nrf2-dipendenti, geni inducibili da SF e, tra questi, geni che codificano per enzimi metabolizzanti xenobiotici come NQO1, GST, GCS e per enzimi biosintetici del glutatione (*Thimmulappa et al., 2002*).

Questi studi hanno evidenziato che fra i prodotti dei geni indotti da SF attraverso la via Nrf2-dipendente sono compresi enzimi metabolizzanti xenobiotici, antiossidanti, proteine che regolano l'adesione, la crescita e il ciclo cellulare, chinasi, fosfatasi, proteine di trasporti e fattori di trascrizione. Nrf2 oltre a mediare la trascrizione dei geni di fase 2 può regolare l'espressione dei trasportatori di fase 3 (*Hu et al., 2006*).

4.3 Induzione degli enzimi di fase 2 mediata dal sulforafano

Gli effetti chemiopreventivi di SF sono dovuti anche alla sua attività modulatrice sugli enzimi di fase 2, i quali convertono i composti cancerogeni in metaboliti inattivi, che vengono rapidamente escreti. Tali enzimi catalizzano reazioni di coniugazione tra ligandi endogeni, quali glutazione e acido glucuronico, e substrati endo- e xenobiotici. Una classificazione più estesa include negli enzimi di fase 2 anche proteine che catalizzano un'ampia varietà di reazioni, che conferiscono alla cellula protezione nei confronti delle ROS e di composti elettrofili.

SF si è dimostrato il più potente induttore naturale degli enzimi di fase 2 sia negli animali che nell'uomo (*Talalay, 2000*), dove c'è una relazione inversa fra il livello di enzimi presenti e la suscettibilità ai composti cancerogeni (*Kwak et al., 2001*).

Gli studi in vitro sulla modulazione dell'espressione genica di fase 2 e sull'attività enzimatica si sono basati su vari modelli di linee cellulari, in particolare cellule derivate da carcinoma epatico, come le HepG2 umane e le Hepalcl7 di topo. SF e i suoi glutazione-coniugati hanno aumentato in modo significativo i livelli di mRNA della UDP-glucuronosiltransferasi (UGT)1A1 e della GSTA1 sia nelle cellule HepG2 che nelle cellule HT29 (*Basten et al., 2002*).

Nelle cellule Hepalcl7 il trattamento con dosi crescenti di SF per 24 ore ha triplicato l'induzione massima di NQO1, rispetto al caso controllo trattato con SF 2.5 μ M (*Matusheski et al., 2001*). SF provoca risposte dose e tempo dipendenti, ma il livello di induzione e/o il tipo di enzima indotto variano in base alle linee cellulari, come riportato in uno studio comparativo che ha valutato l'effetto di SF 25 μ M sull'attività enzimatica dell'aldo-cheto reduttasi (AKR), di NQO1, di GST e della GR in sette linee cellulari: HepG2, MCF7, MDA-MB-231, LNCaP, HeLa e HT-29 (*Jiang et al., 2003*).

Dosi non tossiche di SF hanno incrementato di 11-17 volte i livelli di NQO1, di AKR1C1 e di γ GCS (*Bonnesen et al., 2001*).

Gli effetti sulla modulazione enzimatica di fase 2 sono stati ampiamente studiati nel tumore prostatico umano dove SF (0.1-15 μ M) ha aumentato in modo significativo l'espressione e l'attività di tali enzimi nelle cellule LNCaP, MDA Pca 2a, MDA PCA 2b,

PC-3 e TSU-Pr1. In particolare SF ha causato una marcata induzione della trascrizione del gene di NQO1, accompagnata dall'aumento dell'attività enzimatica di NQO1 nelle cellule prostatiche in vitro (*Brooks et al., 2001*). Recentemente induzioni di GST e NQO1 sono state determinate in culture di cellule della vescica (*Zhang et al., 2006*). SF non è attivo solo nelle cellule tumorali, ma anche su linee cellulari non trasformate. Sono stati scoperti livelli altamente inducibili di NQO1 nella linea cellulare epiteliale RL34 non mutata di ratto, in cui la risposta fenotipica riassume più da vicino l'effetto rispetto a quanto osservato nel fegato di roditore (*McMahon et al., 2003*). Inoltre SF ha indotto l'espressione di NQO1 e delle isoforme A1 e A2 di GST in modo dose e tempo dipendente negli epatociti di ratto (*Payen et al., 2001*), anche se sono stati necessari trattamenti prolungati per ottenere livelli indotti di GST paragonabili a quelli osservati nelle cellule di epatoma (*Maheo et al., 1997*). Allo stesso modo, in culture primarie di epatociti umani appena isolati, SF ha modificato l'espressione di NQO1, ma non la trascrizione di GSTA1 (*Gross-Steinmeyer et al., 2004*).

Inoltre SF ha indotto enzimi detossificanti di fase 2 e l'espressione degli mRNA di UDPG1A1 e GSTA1 negli epatociti umani, nonostante l'aumento di UGT1A1 sia stato soggetto a variazioni individuali (*Petri et al., 2003*). Come altri ITC efficaci nel modulare la risposta enzimatica di fase 2 nelle cellule di mammifero in vitro, SF ha mostrato la sua azione anche in vivo. Somministrato ad alte dosi (fino a 1000 $\mu\text{mol/kg}$ al giorno) per 4 o 5 giorni, ha aumentato i livelli degli enzimi di fase 2 in fegato, polmoni, pancreas, stomaco, colon e ghiandole mammarie di topo e ratto (*Gerhauser et al., 1997; Zhang et al., 1992; Matusheski et al., 2001; Keck et al., 2002*). A dosi minori (40 $\mu\text{mol/kg}$ al giorno) SF ha incrementato l'attività di GST e NQO1 nel duodeno, nella prima parte dello stomaco e soprattutto nella vescica (*Zhang et al., 2006; Munday et al., 2004*). Infine, alle dosi assunte con la dieta, SF ha indotto con meccanismo dose-dipendente NQO1, ma non ha modificato l'attività di GST, di UGT e dell'epossidoidrolasi nei ratti (*Yoxall et al., 2005*).

In generale, quindi, GST è marcatamente meno sensibile all'induzione mediata da SF, rispetto a NQO1. Tale discrepanza è dovuta probabilmente alle numerose sottoclassi di GST: quando viene misurata l'attività totale di GST, una forte induzione di una particolare subunità può essere mascherata parzialmente

dall'attività di altre subunità. Nonostante ciò gli studi sull'uomo hanno evidenziato che un elevato consumo di *Brassicaceae* porta ad un aumento di attività di GST (*Bogaards et al., 1994; Petri et al., 2003*).

Concludendo, anche alle dosi dietetiche, SF può modulare i sistemi enzimatici che metabolizzano gli xenobiotici aumentando la detossificazione dei composti cancerogeni, un importante meccanismo di attività chemiopreventiva.

4.4 Sulforafane e stress ossidativo

SF, pur non essendo un antiossidante diretto (*Zhang et al., 2005*), aumenta le capacità antiossidanti delle cellule animali e la loro resistenza allo stress ossidativo (*Fahey et al., 1999*) mediante l'induzione di enzimi Nrf2-regolati come GST e NQO1 (*Yanaka et al., 2005*).

SF è inoltre un potente induttore di HO-1, che catalizza la conversione dell'eme in biliverdina, a sua volta ridotta enzimaticamente a bilirubina (*Jeong et al., 2005; Prestera et al., 1995; Keum et al., 2006*).

Il gene che codifica per HO-1 viene finemente up-regolato in condizione di stress cellulare e genera prodotti che possono avere importanti attività biologiche. HO-1 mostra effetti antiossidanti, anti-apoptotici e antinfiammatori e sembra avere un ruolo complesso nell'angiogenesi (*Prawan et al., 2005; Ryter et al., 2006*). Le cellule sono dotate di sistemi antiossidanti endogeni che comprendono il GSH e la TR. Il GSH, oltre ad essere il substrato della GST, mantiene il bilancio redox nelle cellule e le protegge dall'azione dei radicali liberi. Gli ITC, per effetto della coniugazione con i tioli intracellulari del GSH si accumulano rapidamente fino a raggiungere livelli 100 e 200 volte maggiori di quelli extracellulari (*Zhang, 2000; Callaway et al., 2004*).

L'esposizione agli ITC come SF porta, almeno temporaneamente, ad una diminuzione del pool di gruppi tiolici, che rende la cellula più suscettibile allo stress ossidativo (*Kim et al., 2003*). Sia la perdita di GSH che la sua ossidazione sono state associate all'aumentata espressione dell'enzima che limita la sintesi di GSH, della glutammil-L-cisteina ligasi (GLCL) e di numerosi altri sistemi detossificanti, quali GST e NQO1, in

risposta alla stimolazione della via di trasduzione del segnale Nrf2-ARE data dagli ITC (*Scharf et al., 2003*). Il trattamento per 24 ore con SF 5 μ M nelle cellule HepG2 ha incrementato significativamente i livelli del contenuto di GSH intracellulare e l'attività di NQO1 e GST. L'attività della GR, enzima che rigenera la forma ossidata di GSH, è risultata inibita da SF nelle cellule Hepalclc7, HepG2, MCF7, MDA-MB-231, LNCaP e HT-29, ma non nelle cellule HeLa, nelle quali si è osservata una debole induzione (*Jiang et al., 2003*). SF, inoltre, ha indotto la GPx, enzima che catalizza la riduzione degli idroperossidi e del perossido di idrogeno, nelle cellule umane Caco-2 (*Hankinson, 1995*) e nelle cellule di topo Hepalclc7 (*Keck et al., 2006*).

La Trx è uno dei fattori ubiquitari responsabili del mantenimento delle proteine nella loro forma ridotta. Sia Trx-1, forma predominante nel citoplasma e nel nucleo, sia Trx-2, la forma mitocondriale, proteggono la cellula dallo stress ossidativo. SF ha up-regolato l'espressione di Trx-1 in modo dose-dipendente nelle cellule HepG2 (*Zhang et al., 2003; Hintze et al., 2003*), nelle Hepalclc7 (*Keck et al., 2006*), nelle MCF-7 (*Wang et al., 2005*) e nelle cellule endoteliali Eahy926 (*Campbell et al., 2007*).

SF contenuto nei broccoli influisce sulla maggior parte delle induzioni trascrizionali ARE-dipendenti di questi geni antiossidanti. Le modificazioni indotte da SF stimolano le difese cellulari contro i composti cancerogeni.

Complessivamente il ruolo di antiossidante indiretto svolto da SF può essere ricondotto all'aumento dei livelli tissutali di GSH, all'azione modulatoria sugli enzimi di fase 2 (GST, NQO1, HO1) e agli effetti sulla regolazione di TR e GLCL (*Zhang et al., 2005*).

CAPITOLO 5

Scopo della tesi

Da alcuni anni la comunità scientifica è concorde nell'indicare lo stress ossidativo come uno dei principali responsabili delle più incidenti patologie del nostro tempo. Le patologie cardiovascolari sono la principale causa di morte nei paesi industrializzati, numerosi studi hanno evidenziato un ruolo di primaria importanza dello stress ossidativo nello sviluppo di numerose fra queste patologie quali danno da ischemia e riperfusione, aterosclerosi e cardiotossicità indotta da composti chimici (*Kang, 2003; Molavi et al., 2004*). In questo contesto la somministrazione di composti antiossidanti esogeni ha mostrato grande efficacia nel contrastare i danni indotti dallo stress ossidativo in modelli animali (*Molavi et al., 2004; Lefer et al., 2000*). Tuttavia, l'utilizzo di antiossidanti esogeni ha portato a risultati contrastanti sia in studi sull'uomo sia su animali, dovuti principalmente alle limitazioni legate all'impiego di tali composti (*Molavi et al., 2004; Kris-Etherton et al., 2004*). Infatti, l'utilizzo di antiossidanti esogeni per proteggere dallo stress ossidativo presenta alcuni svantaggi tra cui una limitata permeabilità cellulare, una scarsa biodisponibilità, così come la comparsa di effetti avversi associati a tali composti che possono contribuire a rendere gli antiossidanti esogeni inefficaci nel contrastare i danni cardiovascolari causati da stress ossidativo (*Witting et al., 2000; Kris-Etherton et al., 2004*).

A tal proposito una promettente strategia, finalizzata alla protezione nei confronti di tali patologie, può essere attuata attraverso l'up-regolazione di antiossidanti endogeni e l'incremento di attività degli enzimi detossificanti di fase 2 nelle cellule cardiache, utilizzando induttori chimici. In particolare, grande interesse è rivolto all'identificazione di induttori di fase 2 presenti nelle piante commestibili poiché sono già parte della dieta.

Gli ITC sono metaboliti secondari derivanti dall'idrolisi dei glucosinolati, una classe di composti presente nei vegetali della famiglia delle Brassicaceae. In particolare SF, il prodotto metabolico della glucorafanina, è contenuto in broccoli, cavolini di Brussels e cavoli.

Questi composti hanno ricevuto una crescente attenzione in virtù delle loro attività biologiche. Ad essi, infatti, sono state attribuite una gamma di importanti proprietà farmacologiche, tra le quali attività antinfiammatoria e chemiopreventiva. Studi epidemiologici effettuati in USA (*Ambrosone et al., 2004, Wang et al., 2004*), Europa (*Brennan et al., 2005*), (*London et al., 2000*) e Singapore (*Seow et al., 2002, Zhao et al., 2001*) hanno infatti dimostrato gli effetti protettivi derivanti dal consumo delle Brassicaceae, come la diminuzione del rischio di tumore alla prostata (*Joseph et al., 2004*), ai polmoni (*Wang et al., 2004*), al seno (*Ambrosone et al., 2004*), al colon e al retto (*Seow et al., 2002*).

Molti degli effetti biologici esercitati dagli ITC sono stati attribuiti alla capacità di modificare lo stato redox della cellula modulando l'espressione di enzimi detossificanti di fase 2 e modificando i livelli di GSH, agendo cioè da antiossidanti indiretti.

Alla luce di quanto detto, scopo della ricerca riportata in questa tesi è stato valutare l'induzione degli enzimi detossificanti/antiossidanti nella cellula cardiaca da parte di SF ed il suo potenziale effetto protettivo nei confronti del danno indotto da stress ossidativo.

Come modello di studio sono state utilizzate colture primarie di cardiomiociti neonatali di ratto. Le cellule sono state supplementate con SF 5 µM per tempi differenti: 6, 12, 24 e 48 ore.

Sono stati valutati gli effetti di SF sull'attività e l'espressione dei principali enzimi detossificanti di fase 2 quali GST, GR, GPx, TR e NQO1, sull'attività dei principali enzimi antiossidanti quali SOD e CAT ed stato valutato il livello di GSH intracellulare. Infine, per verificare se l'incremento di attività degli enzimi detossificanti/antiossidanti presi in considerazione determinasse una maggiore resistenza della cellula allo stress ossidativo causato dal perossido di idrogeno (H₂O₂), sono state valutate la produzione di ROS e la vitalità cellulare.

Alla luce dei risultati ottenuti durante la prima fase del progetto sul modello in vitro di cardiomiociti,

ulteriore scopo della ricerca effettuata è stato quello di valutare se il trattamento con SF sia in grado di esercitare una funzione protettiva nei confronti dello stress ossidativo indotto dall'esercizio fisico acuto ad esaurimento in un modello in vivo.

Sebbene l'esercizio fisico sia stato riconosciuto essere una componente fondamentale di un sano stile di vita, permette infatti di prevenire l'insorgenza e contrastare la progressione di numerose patologie, esistono casi in cui l'esercizio può rappresentare una fonte di stress in grado di aggravare il quadro ossidativo di un soggetto. Quando l'attività motoria è troppo intensa, oltre al rischio di lesioni muscolari e tendinee si può verificare uno squilibrio nel bilancio redox dell'organismo portando così a perdere tutti i potenziali effetti benefici dell'attività fisica e all'esposizione a tutti i rischi collegati ad un'elevata produzione di ROS.

Molti soggetti credendo di condurre un corretto stile di vita svolgono, saltuariamente e senza un corretto allenamento, attività fisiche intense e molto prolungate, senza considerare che in questo modo si espongono agli effetti deleteri dell'attività acuta ad esaurimento. È ormai noto che l'esercizio fisico acuto ad esaurimento causa una significativa produzione di ROS, instaurando uno stato di stress ossidativo che può indurre effetti negativi sulla salute e il benessere generale. Infatti, è stato osservato un incremento di diversi biomarcatori dello stress ossidativo dopo uno sforzo acuto e breve (*Cuevas et al., 2005*), dopo un esercizio ad esaurimento sulla lunga distanza, così come in esercizi di resistenza (*Almar et al., 2002*) in soggetti allenati e non. È stato osservato anche un incremento dei marker di stress ossidativo in roditori dopo un esercizio esaustivo (*Alonso et al., 2006*).

Come modello di studio sono stati utilizzati ratti Wistar adulti. Gli animali sono stati trattati con SF 25 mg/kg p.c. e sottoposti ad una sessione acuta di esercizio fisico ad esaurimento. Sono stati valutati gli effetti di SF sull'attività dei principali enzimi detossificanti di fase 2 quali GST, GR, GPx, TR e NQO1 e su alcuni dei principali enzimi antiossidanti primari come SOD e CAT, in campioni di tessuto muscolare ottenuti dopo sacrificio degli animali. Infine, per verificare se il trattamento con SF determinasse una maggiore resistenza dei tessuti allo stress indotto dall'esercizio è stata valutata l'attività dell'enzima lattico deidrogenasi (LDH) nel plasma.

Capitolo 6

Materiali e metodi

6.1 Materiali

SF è stato acquistato da VinciBiochem (IT), Il terreno di coltura (DMEN F-12), i sieri (FCS e HS), Il tampone di lisi cellulare (Cell Lytic and Protease Inhibitor Cocktail), la soluzione di WST-1 e l'enzima SOD standard, la 2',7'-diclorofluorescina diacetato (DCFH-DA), il monoclorobimano (MCB), 1-cloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), l'acido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB), il glutatione (GSH), sono stati acquistati da Sigma-Aldrich Co.

Il Total RNA isolation Mini Kit è stato fornito da Agilent Technologies, Palo Alto CA., mentre il ReactionReady First-Strand cDNA Synthesis Kit è stato fornito da SuperArray.

I reagenti necessari alle tecniche di immunoblotting: soluzione di rivelazione (enhanced chemiluminescence detection kit), pellicola fotografica (Hyperfilm ECL) sono stati acquistati da Amersham Bioscience. Gli anticorpi anti GST, anti GR sono stati acquistati presso Cell Signaling Technology, mentre anti GPx presso Santa Cruz Biotechnology, ed anti TR, anti NQO1 presso Chemicon International.

6.2 Colture cellulari di cardiomiociti neonatali, e supplementazione con sulforafane

Le colture di cardiomiociti neonatali sono state allestite da cuori di ratti Wistar (Harlan-Italy) di 2-4 giorni di vita (Yagev *et al.*, 1984). I ratti sono stati sacrificati per decapitazione, il torace inciso ed i ventricoli cardiaci prelevati. In figura 4.1 sono schematizzate le varie fasi del procedimento. I ventricoli, derivati da un numero variabile di 30-60 ratti, sono stati posti in un particolare medium, definito special medium (946 mg/100 mL Ham-F10, KH_2PO_4 93 mM, Na_2HPO_4 38.5 mM, NaHCO_3 1.2 M ed inositolo 0.5 mM (Sigma-Aldrich Co.), lavati in questo medium e finemente sminuzzati.

Lo special medium è stato quindi sostituito con il medium di tripsinizzazione, ottenuto aggiungendo tripsina (0.25% v/v) (Sigma-Aldrich Co.) allo special medium, in quantità di 1 mL per ogni 100 mg di tessuto. I frammenti di tessuto sono stati posti in un recipiente cilindrico sterile di vetro, chiusi e lasciati alla temperatura di 4°C overnight. Successivamente il medium contenente la tripsina è stato rimosso, lasciando il tessuto immerso in un piccolo volume residuo (meno di 1/10 del volume iniziale). Il recipiente è stato posto in un incubatore a 37°C, CO_2 5%, umidità 95%, e lasciato in incubazione per 30 minuti, in agitazione continua.

Questo metodo di tripsinizzazione “a freddo” presenta il vantaggio di danneggiare solo in minima parte le cellule durante il periodo di disaggregazione, rispetto ai metodi che utilizzano esposizioni alla tripsina per tempi molto lunghi alla temperatura di 37°C. Infatti, la tripsina, il cui optimum di temperatura è intorno ai 37°C, durante le 18 ore a 4°C è pressoché inattiva, ma imbibisce i frammenti di tessuto cardiaco. I successivi 30 minuti a 37°C sono pertanto sufficienti ad ottenere una disaggregazione del tessuto senza determinare un danno alle cellule.

Si è quindi proceduto alla risospensione dei frammenti di tessuto in medium completo (DMEM F-12 supplementato con il 10% (v/v) di siero bovino fetale (FCS), il 10% (v/v) di siero di cavallo (HS), l'1% (v/v) di sodio piruvato, penicillina (100 U/mL), streptomicina (100 mg/mL), in rapporto di 1 mL di medium/100 mg di tessuto iniziale. In tale medium le cellule sono state disgregate ulteriormente con l'ausilio di una pipetta pasteur sterile.

La sospensione così ottenuta è stata filtrata attraverso una garza sterile in una fiasca per colture cellulari e incubata a 37°C, CO₂ 5%, umidità 95%, per 30 minuti. La fiasca è stata quindi ben agitata e la sospensione di cellule, travasata in una seconda fiasca, incubata nelle condizioni precedenti per 60 minuti.

Queste due fasi di incubazione della sospensione di cellule, definite di “pre-plating”, hanno lo scopo di rendere la coltura di cardiomiociti la più pura possibile. In particolare, durante il “pre-plating”, le cellule non muscolari presenti, caratterizzate da una maggiore adesività ai supporti di plastica, aderiscono saldamente al fondo della fiasca, mentre i cardiomiociti rimangono nella sospensione; quest’ultima risulterà quindi virtualmente “pura” al successivo travaso.

Terminate le fasi di “pre-plating”, le cellule sono state contate con l’ausilio di un emocitometro e, attraverso una diluizione con medium completo, portate ad una concentrazione di 1.2×10^6 cellule/mL.

La sospensione di cellule così ottenuta è stata seminata in piatti petri e incubata a 37°C, CO₂ 5%, umidità 95%.

Ogni 48 ore è stato effettuato il cambio medium: il medium di crescita delle cellule è stato aspirato dai piatti petri con l’ausilio di una pompa da vuoto e sostituito con un nuovo medium completo.

SF è stato solubilizzato in dimetilsolfossido (DMSO) alla concentrazione 10 mM, conservato a -20°C e diluito alla concentrazione opportuna al momento dell'utilizzo in medium completo.

Le cellule, una volta giunte a confluenza, sono state trattate con SF 5 µM per tempi differenti (6, 12, 24 e 48 ore).

6.2.1 Preparazione dei lisati cellulari

Al termine di ogni esperimento è stato eliminato il medium di coltura dai piatti Petri e le cellule sono state staccate dal supporto di plastica con l'ausilio di un “cell scraper”, utilizzando 6 mL di PBS freddo. Le sospensioni cellulari così ottenute sono state centrifugate a 300 g per 10 minuti a 4°C ed il surnatante eliminato. Ai pellet sono stati aggiunti 150 µL di tampone di lisi. I campioni sono stati mantenuti a 4°C per 60 minuti, vortexando ogni 10 minuti per favorire la lisi cellulare.

I campioni sono stati centrifugati a 12000 g per 15 minuti per far precipitare i debris cellulari non lisati, il surnatante è stato

rimosso, aliquotato e conservato a -80°C ed utilizzato entro una settimana.

6.2.2 Preparazione dei lisati cellulari da sottoporre a tecniche di immunoblotting

Le cellule, seminate alla concentrazione di $1,5 \times 10^6$ cellule/mL, sono state scrapate in PBS freddo (6 mL totali) e centrifugate a 500 g per 5 min, il pellet ottenuto è stato risospeso in 300 μL di tampone di lisi (Tris 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, Triton \times 100 allo 0.1%) contenente anche i seguenti inibitori di proteasi: fenilmetilsolfonilfluoruro 1 mM ed 1 $\mu\text{g/mL}$ di aprotinina, pepstatina e leupeptina ed inibitori delle fosfatasi quali sodio fluoruro, sodio pirofosfato e sodio vanadato. I lisati cellulari sono stati congelati a -20°C e mantenuti a questa temperatura overnight. I campioni scongelati sono stati poi centrifugati per 10 min a 600 g ed utilizzando il sovrantante è stata misurata la concentrazione delle proteine in accordo al metodo di Bradford.

I lisati cellulari ottenuti sono stati trattati successivamente con Loading Buffer (Tris-Cl 1 M pH 6.8, SDS 8%, glicerolo 20%, blu di bromofenolo 0.024% e β -mercaptoetanol 4%; quest'ultimo è stato aggiunto solo al momento dell'uso) e successivamente bolliti per 5 minuti; tale processo conduce alla denaturazione delle proteine con scissione di eventuali ponti disolfuro. I campioni così preparati sono stati conservati a -20°C fino all'analisi successiva.

6.3 *Modello animale e protocollo di esercizio fisico*

Tutti gli esperimenti condotti sono stati eseguiti rispettando le *Guiding Principles for Research Involving Animals (NAS, 1991)*.

Questa parte del progetto è stata condotta in collaborazione con il gruppo del Prof. Javier Gonzalez Gallego, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Leon, Spagna.

Un gruppo di 32 ratti Wistar maschi (età 4 mesi, peso 230 ±20 g) è stato stabulato in ambiente controllato la cui temperatura era termostata a 22°C; il cibo (Panlab, Barcelona, Spain) e l'acqua erano disponibili ad libitum, mentre il rapporto tra ore di luce e di buio era di 12:12 e il programma di luce-buio è stato regolato in modo che i ratti fossero esposti alla luce dalle 8:00 alle 20:00.

I ratti sono stati divisi in quattro gruppi da 8 animali ciascuno: un gruppo di controllo (C), un gruppo di controllo a cui è stato somministrato SF (S), un gruppo sottoposto ad esercizio fisico acuto ad esaurimento (E), un gruppo sottoposto ad esercizio fisico acuto ad esaurimento a cui è stato somministrato SF (ES).

Durante la settimana precedente l'esercizio acuto ad esaurimento tutti gli animali sono stati abituati a correre su un treadmill specifico per ratti (model LI8706, Letica, Barcelona, Spain) ad una velocità iniziale di 24 m/min per 10 min. Questo protocollo ha fatto sì che i ratti fossero in grado di correre sul treadmill durante l'esercizio finale, senza tuttavia determinare adattamenti muscolari all'allenamento.

Durante i tre giorni precedenti l'esperimento ai ratti dei gruppi S ed ES è stata somministrata ogni 24 ore, per via intraperitoneale, una dose di sulforafane (25 mg/kg p.c. in 0.5 ml di soluzione allo 0.9% di NaCl e 0.5% di etanolo, mentre i ratti dei gruppi C ed E sono stati trattati con un'uguale quantità di soluzione allo 0.9% di NaCl e 0.5% di etanolo. L'ultimo trattamento è stato effettuato 24 ore prima dell'esercizio. Il giorno dell'esperimento i ratti dei gruppi S ed ES sono stati sottoposti ad un singolo esercizio acuto ad esaurimento su treadmill alla velocità di 24 m/min e alla pendenza del +7%. L'esaurimento è stato determinato come momento oltre il quale i ratti non erano più in grado di proseguire l'attività. Terminato l'esercizio i ratti sono stati immediatamente anestetizzati con una dose intraperitoneale di pentobarbital sodico (50 mg/kg di peso corporeo) e sacrificati.

Sono stati prelevati campioni di sangue intero, utilizzando eparina come anticoagulante e il plasma è stato ottenuto per centrifugazione (1500 x g, 10 min, 4°C) e conservato alla temperatura di -80 °C. I campioni di tessuto muscolare (vasto laterale) sono stati prelevati con l'ausilio di un bisturi, rapidamente posti in azoto liquido, per esser poi conservati alla temperatura di -80°C.

6.3.1 Preparazione degli omogenati di tessuto muscolare

Un'aliquota di circa 100 mg di ogni campione di tessuto muscolare è stata omogenata, in rapporto 1:10 con il tampone di omogeneizzazione freddo (soluzione fosfato 100 mM pH 7.4, 1% di EDTA, contenente NaF 50 mM, sodio vanadato 1 mM, sodio pirofosfato 1 mM e un cocktail di inibitori delle proteasi), per 90 sec con un omogenizzatore (IKA[®] - WERKE) dotato di pestello di teflon che ruotava alla velocità di 500 rpm. Gli omogenati così preparati sono poi stati centrifugati alla velocità di 10000 g, alla temperatura di 4°C per 15 min. La frazione citosolica, sovrantante, è quindi stata conservata a -80°C fino al momento delle analisi dopo averne determinato il contenuto di proteine secondo il metodo di Bradford.

Un'aliquota degli omogenati ottenuti è stata utilizzata per la preparazione di campioni da sottoporre ad analisi di immunoblotting. I campioni sono quindi stati trattati con Loading Buffer (Tris-Cl 1 M pH 6.8, SDS 8%, glicerolo 20%, blu di bromofenolo 0.024% e β -mercaptoetanololo 4%; quest'ultimo è stato aggiunto solo al momento dell'uso) e successivamente bolliti per 5 minuti; tale processo conduce alla denaturazione delle proteine con scissione di eventuali ponti disolfuro. I campioni così preparati sono stati conservati a -20°C fino all'analisi successiva.

6.4 Determinazione delle attività enzimatiche

6.4.1 Valutazione dell'attività dell'enzima glutatione S-transferasi

Per la determinazione dell'attività della GST è stato impiegato un metodo che utilizza come substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), in grado di interagire con la maggior parte degli isoenzimi GST. Dopo coniugazione del gruppo tiolico del glutatione al CDNB, si verifica un incremento di assorbanza a 340 nm. La GST, infatti, catalizza la coniugazione del glutatione al substrato CDNB secondo la seguente reazione:



Il GS-DNB assorbe a 340 nm e l'entità dell'incremento di assorbanza è proporzionale all'attività della GST. Sono state calcolate le variazioni di assorbanza (ΔA_{340})/min sia per i campioni sia per il bianco utilizzando la seguente equazione:

$$\Delta A_{340}/\text{min} = \frac{A_{340}(\text{finale}) - A_{340}(\text{iniziale})}{\text{Tempo di reazione (min)}}$$

L'attività di GST è stata calcolata attraverso l'equazione:

$$\frac{A_{340}/\text{min} * V(\text{ml}) * \text{dil}}{\epsilon_{mM} * V_{enz}(\text{ml})} = \mu\text{mol}/\text{ml}/\text{min}$$

dove:

dil : fattore di diluizione

ϵ_{mM} ($mM^{-1}cm^{-1}$): coefficiente del coniugato di CDNB a 340 nm

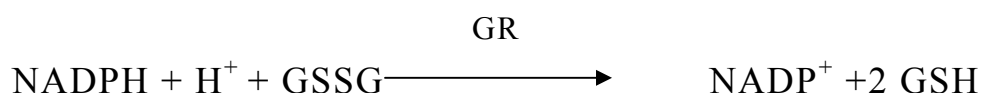
V: il volume di reazione

V_{enz} : il volume dei campioni testati.

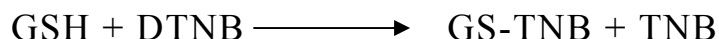
L'attività di GST è stata espressa come nmol/min/mg proteine.

6.4.2 Valutazione dell'attività dell'enzima glutatione reduttasi

Per la determinazione dell'attività della GR è stato impiegato un metodo che si basa sulla riduzione di GSSG (2mM) ad opera del NADPH (2mM) in presenza di glutatione reduttasi:



Il glutatione ridotto formato può successivamente reagire in maniera spontanea con acido 5,5'-Ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB) (3mM) secondo la seguente reazione:



La prima reazione può essere misurata attraverso una riduzione di assorbanza a 340 nm, provocata dalla diminuzione di NADPH, mentre la seconda attraverso un aumento di assorbanza a 412 nm, dato da un aumento di TNB.

In entrambi i casi le variazioni rilevate sono proporzionali all'attività dell'enzima GR.

L'attività dell'enzima è stata calcolata utilizzando la formula:

$$\text{unità/ml} = \frac{(\Delta A_{\text{campione}} - \Delta A_{\text{bianco}}) * \text{dil}}{\epsilon_{mM} * V_{\text{campione}} (\text{ml})}$$

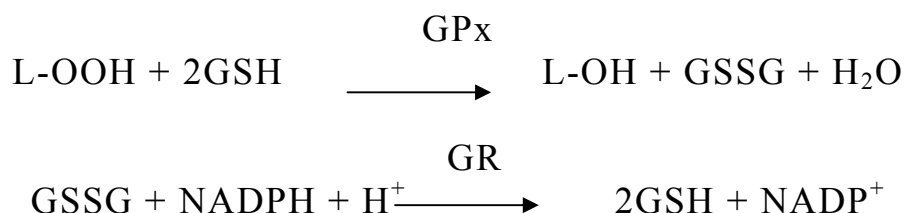
$$\text{per NADPH } \epsilon^{mM} = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\text{per TNB } \epsilon^{mM} = 14.15 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

Un'unità di GR è quella che causa la riduzione di 1 μmol di DTNB a TNB a 25°C, pH 7.5.

6.4.3 Valutazione dell'attività dell'enzima glutatione perossidasi

L'attività della GPx-1 è stata determinata con il metodo di Paglia e Valentine (1967), modificato da Gunzler et al. (1974), utilizzando terbutil-idroperossido (Sigma-Aldrich Co.) come substrato. E' un metodo di determinazione enzimatico indiretto basato sull'ossidazione del GSH a GSSG, catalizzata dalla GPx. La rigenerazione del GSH è ottenuta accoppiando la precedente reazione a quella catalizzata dalla glutatione reduttasi (GR) che riduce il GSSG a GSH. La riduzione del GSSG si accompagna all'ossidazione del NADPH a NADP⁺. La diminuzione di assorbanza a 340 nm, lunghezza d'onda che rappresenta il massimo di assorbimento del NADPH, indica l'entità dell'ossidazione del NADPH a NADP⁺. Questo è indicativo dell'attività della GPx, poiché la reazione catalizzata dalla GPx rappresenta la tappa limitante l'intero processo catalitico.



Al termine di ogni esperimento le cellule sono state lavate con PBS e ad ogni piatto sono stati aggiunti 2 mL di tampone potassio fosfato 50 mM, pH 8, contenente EDTA 0.5 mM (Sigma-Aldrich Co.). Le cellule, mantenute in ghiaccio, sono state rimosse dal supporto di plastica mediante l'utilizzo di un "cell scraper". La sospensione di cellule così ottenuta è stata omogenata utilizzando un potter a bassissima velocità. I campioni sono stati centrifugati a 4°C a 2000 g per 25 minuti ed è stato prelevato il sovrantante. L'attività della GPx è stata valutata spettrofotometricamente su aliquote del surnatante ottenuto dai diversi campioni in presenza di NADPH 5 mM, GSH 42 mM e 10 U/mL di glutatione reduttasi. La reazione è stata infine avviata con l'aggiunta di 10 µL di terbutil-idroperossido 30 mM.

L'attività della GPx-1 è stata espressa come mU/mg di proteina. La concentrazione proteica è stata valutata utilizzando il metodo di *Bradford (1976)*. Un'unità di GPx è la quantità di

enzima in grado di determinare la formazione di 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ di NADP^+ a pH 8.0, ad una temperatura di 25°C in presenza di GSH, glutatione reduttasi e terbutil-idroperossido 30 mM.

6.4.4 Valutazione dell'attività dell'enzima superossido dismutasi

Per la determinazione dell'attività della SOD è stato impiegato un metodo che sfrutta la capacità della molecola, solubile in acqua, (2-(4-Iodofenil)- 3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio, sale monosodico) (WST-1) di formare un sale di formazano, che assorbe alla lunghezza d'onda di 450 nm, quando reagisce in presenza di $\text{O}_2^{\cdot-}$. Il sistema di reazione utilizza come fonte di $\text{O}_2^{\cdot-}$ la reazione tra xantina e xantina ossidasi. La presenza di SOD nel campione sequestra parte del $\text{O}_2^{\cdot-}$ prodotto riducendolo ad acqua ossigenata e ossigeno impedendogli di reagire con WST-1e formare il sale di formazano colorato. L'assorbanza è stata misurata utilizzando un lettore di piastre multipozzetto (VICTOR3 V™ Multilabel Counter, Perkin Elmer). L'attività della SOD è stata calcolata come percentuale di inibizione rispetto al bianco, convertita in U/mg di proteina grazie ad una retta di taratura.

$$\% \text{ inibizione} = [(A_{\text{bianco}} - A_{\text{campione}})/A_{\text{bianco}}] \times 100$$

Costruendo una retta di taratura utilizzando enzima SOD purificato disponibile commercialmente è possibile calcolare l'attività dei campioni in U/mg di proteina:

$$\frac{(\% \text{ inibiz campione} - y \text{ intercetta}) * \text{diluizione} * \text{mg}_p}{\text{Pendenza} * V_{\text{enz}}(\text{ml})} = U/\text{mg}_p$$

dove:

y intercetta: valore di intersezione tra la retta di taratura e l'asse delle ordinate

pendenza: coefficiente angolare della retta di taratura

mg_p: mg di proteine contenute nel campione

Il sistema di reazione è schematizzato in figura 6.1a, mentre la reazione di formazione del sale di formazano è riportata in figura 6.1 b

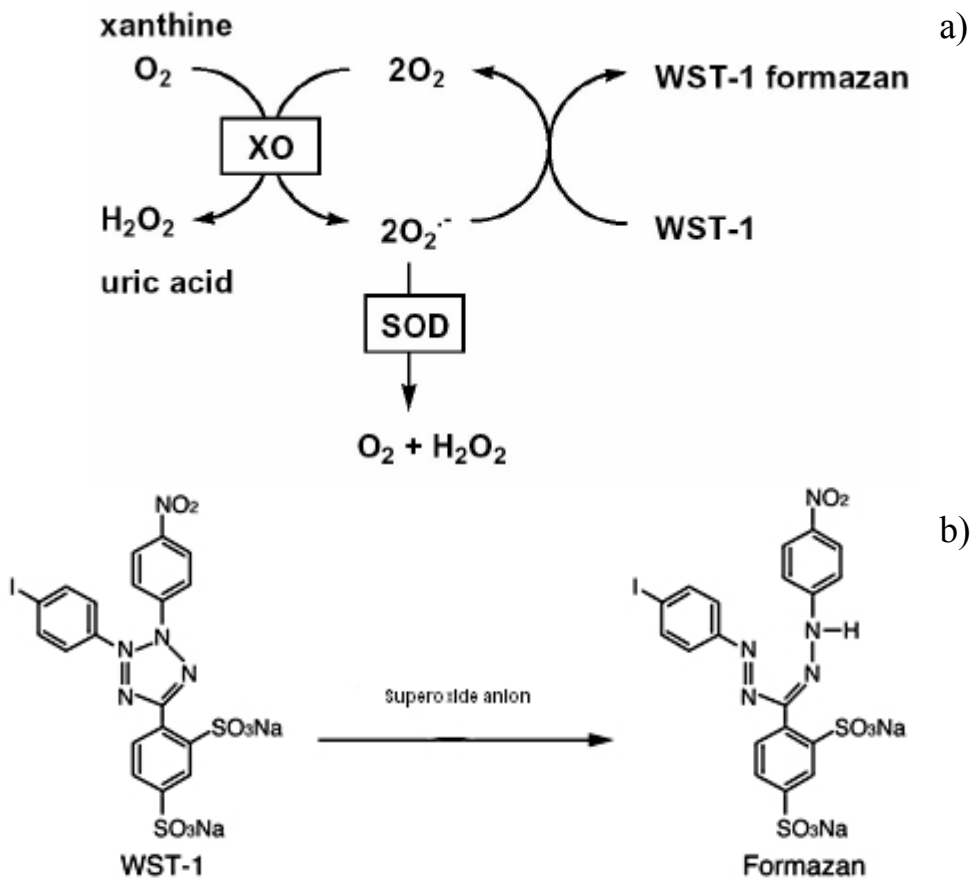
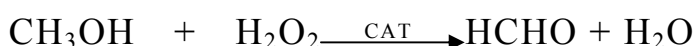


Figura 6.1: determinazione dell'attività della SOD (a) schematizzazione del sistema di reazione per la determinazione dell'attività della SOD. Si può notare come la SOD sottraendo anione superossido al sistema impedisca l'ossidazione di WST-1 a formazano determinando così una riduzione dell'assorbimento della soluzione a 450nm. (b) modificazione della struttura del WST-1 in seguito alla reazione con $O_2^{\bullet -}$

Un'unità di SOD inibisce del 50% la riduzione del citocromo c in un sistema accoppiato con XO a pH 7,8 e temperatura di 25°C.

6.4.5 Valutazione dell'attività dell'enzima catalasi

Per la determinazione dell'attività della CAT è stato impiegato un metodo che sfrutta la capacità perossidativa dell'enzima CAT stesso. Il metodo si basa sulla reazione della CAT con il metanolo (CH₃OH) in presenza di acqua ossigenata (H₂O₂) per generare formaldeide (HCHO), questa reazione è stata bloccata dopo un tempo di 20 minuti (tempo di reazione) con l'aggiunta di idrossido di potassio 4M (KOH).



La formazione di HCHO è misurata spettrofotometricamente grazie all'utilizzo del cromogeno Purpald (4-ammino-3-idrazino-5-mercapto-1,2,4-triazolo). In presenza di aldeidi il Purpald forma un eterociclo biciclico che, in presenza di periodato (IO₄⁻), cambia la propria colorazione con un massimo di assorbimento alla lunghezza d'onda di 540 nm. L'assorbanza è stata misurata utilizzando un lettore di piastre multipozzetto (VICTOR3 VTM Multilabel Counter, Perkin Elmer).

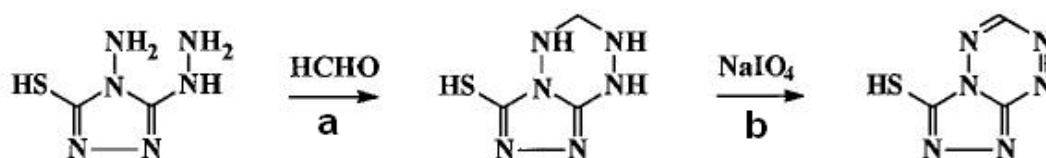


Figura 6.1: a) reazione di ciclizzazione tra Purpald e formaldeide, b) il prodotto della ciclizzazione viene ossidato in presenza di anione periodato per formare un composto che assorbe alla lunghezza d'onda di 540 nm.

Dopo aver costruito una retta di taratura utilizzando HCHO standard a diverse concentrazioni, l'attività della CAT è stata calcolata secondo la seguente formula:

$$\frac{(\text{Assorbanza campione} - y \text{ intercetta}) * \text{diluizione} * \text{mg}_p}{\text{Pendenza} * \text{tempo di reazione} * V_{enz}(\text{ml})} = \text{nmol/min/mg}_p$$

dove:

y intercetta: valore di intersezione tra la retta di taratura e l'asse delle ordinate

pendenza: coefficiente angolare della retta di taratura

mgp: mg di proteine contenute nel campione

6.4.6 Valutazione dell'attività dell'enzima NADPH-chinone reduttasi

Il saggio della chinone reduttasi è stato effettuato misurando la riduzione dell' MTT NADPH-dipendente menadiolo-mediata (Figura 4.2).

Eliminato il medium dalle cellule seminate in piastre da 96 pozzetti, sono stati addizionati 50 μ L di lysis solution (0.8% digitonina, 2mM EDTA, pH 7.8) in ogni pozzetto. Le piastre sono state poste su un agitatore di piastre e agitate a 300 rpm per 10 minuti a temperatura ambiente. Successivamente sono stati aggiunti 200 μ L di mix di reazione [6.225 mL di TRIS-HCl 0,5 M, 83 mg di albumina sierica bovina (BSA), 830 μ L di Tween 20 (1,5%), 83 μ L di FAD 7.5 mM, 830 μ L di glucosio 6-fosfato (G6P) 150 mM, 74.7 μ L di NADP 50 mM, 1.7 mL di glucosio 6-P deidrogenasi (250U), 37.35 mg di MTT e acqua bidistillata fino ad un volume finale di 125 mL]. E' stata quindi rilevata l'assorbanza a 595 nm, mediante spettrofotometro.

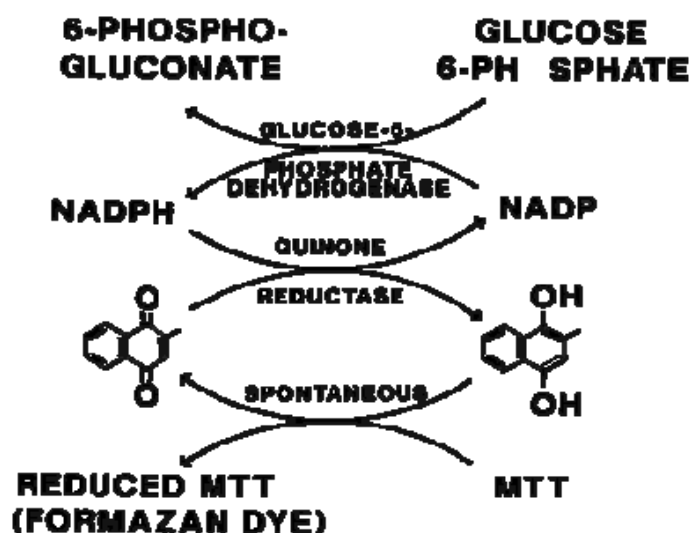


Figura 6.2: schema delle reazioni di riduzione dell'MTT.

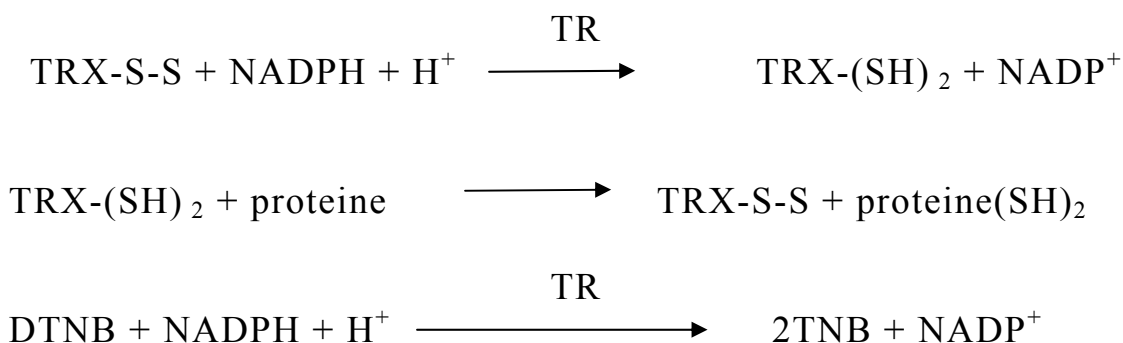
L'attività dell'enzima è stata calcolata attraverso la seguente formula:

$$\frac{\Delta_{595} / \text{min} * V (\text{ml}) * \text{dil}}{\epsilon_{mM} * V_{enz} (\text{ml})} = \text{nmol/min}$$

6.4.7 Valutazione dell'attività dell'enzima tioredoxina reduttasi

Per la determinazione dell'attività della tioredoxina reduttasi è stato utilizzato un saggio colorimetrico basato sulla riduzione NADPH mediata del DTNB, che porta alla produzione di TNB, caratterizzato da una intensa colorazione gialla, misurata a 412 nm (Holmgren et al., 1995).

La reazione di riduzione, mediata in vivo dalla tioredoxina reduttasi, si verifica secondo il seguente schema:



Per ogni mole di NADPH ossidato si formano due moli di TNB.

Il saggio è stato effettuato a temperatura ambiente (25°C) ed il massimo di assorbimento per il TNB si verifica a 412 nm (coefficiente di estinzione molare 14,150 M⁻¹cm⁻¹).

Nei campioni biologici sono presenti altri enzimi, quali la glutatione reduttasi e la glutatione perossidasi, in grado di ridurre il DTNB, perciò, per evitare di ottenere dei falsi positivi, è stato impiegato un inibitore specifico della tioredoxina reduttasi.

In primo luogo è stata misurata la riduzione totale di DTNB e successivamente la riduzione in presenza di inibitore, la differenza tra i due risultati ha fornito la riduzione di TNB dovuta alla sola tioredoxina reduttasi.

L'attività dell'enzima è stata calcolata attraverso la seguente formula:

$$\text{unità/ml} = \frac{\Delta A_{412}/\text{min} (\text{tioredoxina riduttasi}) * \text{dil}}{V_{\text{enz}} (\text{ml})} \quad \text{Dove:}$$

$$\Delta A_{412}/\text{min}(\text{tioredoxina riduttasi}) = \Delta A_{412}/\text{min} (\text{campione}) - \Delta A_{412}/\text{min} (\text{campione} + \text{inibitore})$$

dil: fattore di diluizione

V_{enz} : il volume dei campioni testati.

Un'unità di TR è quella che causa un incremento nell'assorbanza misurata a 412 nm di 1.0 per minuto a 25°C, pH 7.0.

6.4.8 Valutazione dell'attività dell'enzima lattico deidrogenasi nel plasma

Il dosaggio dell'attività dell'enzima LDH è stato eseguito su aliquote di plasma, secondo il metodo di Korzeniewski C. et Callewaert D.M. (1983).

Il plasma è stato ottenuto per centrifugazione (1500 x g, 10 min, 4°C) a partire da campioni di sangue intero prelevato al momento del sacrificio, utilizzando eparina come anticoagulante.

L'attività dell'enzima è stata misurata spettrofotometricamente alla lunghezza d'onda di 340 nm, come variazione dell'assorbanza del NADH in un sistema contenente piruvato 10 mM, NADH 1.5 mM, tampone fosfato pH 7.4 e 100 µl di plasma come fonte dell'enzima.



L'attività della LDH è stata calcolata secondo la seguente relazione:

$$\text{Unità/mL} = \frac{(\Delta A_{\text{campione}}/\text{min} - \Delta A_{\text{bianco}}/\text{min}) * v * d}{6.22 * 0.1}$$

dove:

v = Volume totale in mL del saggio

d= fattore di diluizione del campione
6.22 = coefficiente di estinzione molare
0.1 = volume in mL di enzima utilizzato

6.5 Estrazione di RNA e RT-PCR

RNA totale è stato estratto utilizzando il Total RNA Isolation Mini Kit (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). La purezza e la quantità di RNA estratto sono state misurate utilizzando lo spettrofotometro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Rockland, DE). I livelli di espressione dei geni che codificano per gli enzimi GST, GR, GPx, NQO1, TR sono stati valutati misurando i livelli dei rispettivi mRNA. A partire da 1 µg di RNA totale è stato sintetizzato il corrispondente cDNA utilizzando il ReactionReady First-Strand cDNA Synthesis Kit (SuperArray). Il cDNA è stato quindi trascritto inversamente a 37°C per 60 minuti, al termine dei quali la reazione è stata bloccata riscaldando il sistema a 95°C per 5 minuti. La reazione di PCR è stata eseguita in un volume di 25 µl contenente ReactionReady HotStart Sweet PCR master mix (10mM Tris HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, e Taq DNA polimerasi), 0,4 µl di ogni primer e 1µl di cDNA diluito. L'amplificazione del cDNA è stata iniziata denaturando i campioni a 95°C per 10 minuti, seguiti da 35 cicli composti da 15 secondi a 95°C, 30 secondi a 55°C e 30 secondi a 72°C, infine i campioni sono stati mantenuti a 72°C per 7 minuti.

Sei µl del prodotto amplificato sono quindi stati separati per elettroforesi su gel di poliacrilamide al 10% (Bio-Rad); le diverse bande sono state rivelate con etidio bromuro e visualizzate per mezzo di luce UV (Versa Doc 4000 Immagine System, Bio-Rad).

6.6 Immunoblotting

Dopo aver allestito la camera per SDS-PAGE, i campioni ottenuti sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel di poliacrilammide al 10% (per un gel di circa 10 mL occorrono: 4.0 mL di H₂O, 3.4 mL di acrilammide 30%, 2.6 mL di tampone Tris, pH 8.8 1.5 M, 100 µL di SDS 10%, 100 µL di ammonio persolfato 10% e 4.0 µL di TEMED) applicando una differenza di potenziale di 80 mV per almeno 60 minuti.

Al termine della corsa elettroforetica, le bande separate sono state trasferite su una membrana di nitrocellulosa tramite elettroblotting, applicando una differenza di potenziale di 110 mV per 90 minuti. Successivamente la membrana è stata saturata per un'ora circa con latte fat-free in polvere al 5% in TBS Tween (Tris 10 mM pH 8, NaCl 150 mM, Tween-20 0.05%) ed incubata con l'anticorpo primario specifico, per tutta la notte a 4° C su agitatore orbitante.

Dopo tre lavaggi con TBS/Tween, la membrana è stata incubata per 60 minuti con l'anticorpo secondario anti-IgG di coniglio, coniugato con perossidasi, diluito 1:2000.

Trascorso il tempo indicato, sono stati eseguiti altri tre lavaggi con TBS/Tween e si è proceduto alla rivelazione. Questa è stata effettuata incubando la membrana di nitrocellulosa, per un minuto, con una soluzione di rivelazione enhanced chemiluminescence (ECL) detection kit, che genera chemiluminescenza per effetto dell'attività della perossidasi legata all'anticorpo secondario. Tenendo conto che la chemiluminescenza permane per 15 minuti, in camera oscura si impressiona una pellicola fotografica Hyperfilm ECL delle dimensioni del foglio di nitrocellulosa. Infine, dopo aver trattato la lastra con soluzione di sviluppo, fissaggio e lavaggio in acqua, è stato possibile visualizzare le bande relative ai campioni e quelle relative agli standard introdotti come riferimento.

Sono stati utilizzati anticorpi anti GST, anti GR, anti GPx, anti TR, anti NQO1.

6.7 Valutazione dei livelli intracellulari di glutatione ridotto

Il contenuto di GSH intracellulare è stato determinato utilizzando la sonda fluorescente monoclorobimano (MCB). GSH viene coniugato in modo specifico da MCB formando l'addotto fluorescente GSH-bimano, attraverso una reazione catalizzata dalla GST. La concentrazione dell'addotto aumenta progressivamente durante i primi 10-12 minuti di reazione seguendo una cinetica di primo ordine.

Le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti. Dopo la supplementazione con SF il medium è stato rimosso e le cellule sono state lavate con 0.2 mL di PBS per due volte ed incubate a 37°C per 30 minuti in 0.1 mL di PBS contenente MCB 25 µM.

Dopo l'incubazione l'intensità di emissione è stata determinata a 460 nm, in seguito ad eccitazione a 355 nm, utilizzando un lettore di piastre multipozzetto (VICTOR3 V™ Multilabel Counter, Perkin Elmer).

6.8 Valutazione della formazione intracellulare di specie reattive dell'ossigeno

La valutazione dello stress ossidativo cellulare è stata effettuata utilizzando 2',7'-diclorofluorescina diacetato (DCFH-DA). Tale composto diffonde all'interno della cellula, dove viene enzimaticamente diacetilato da esterasi intracellulari che lo riducono a DCFH, un composto più idrofilo e non fluorescente. In presenza di specie reattive dell'ossigeno, DCFH è rapidamente ossidato nel composto fluorescente DCF (Figura 4.3).

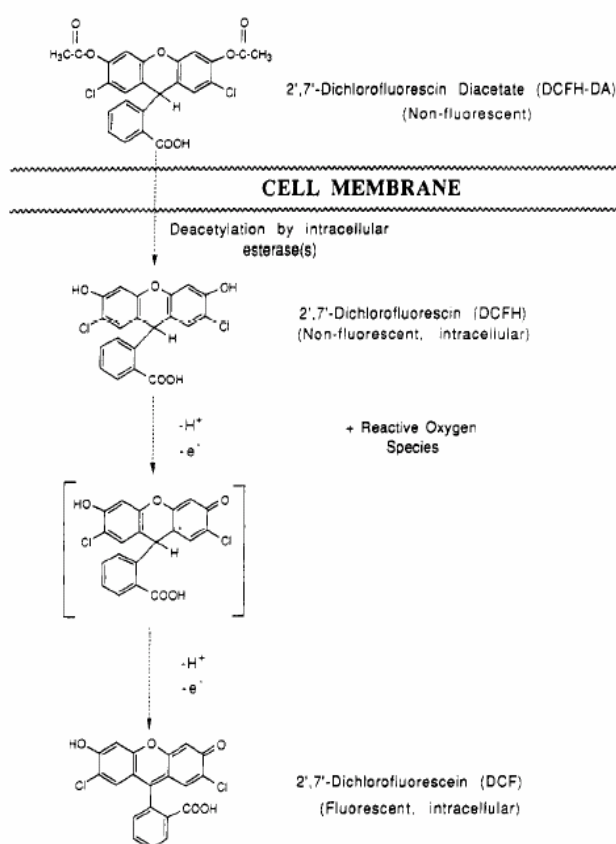


Figura 6.3: meccanismo d'azione della DCFH nella valutazione della produzione di ROS.

Dalle cellule supplementate con SF per tempi differenti (6, 12, 24 e 48 ore), è stato eliminato il terreno di coltura e sono stati aggiunti 100 μ L di soluzione di DCFH-DA in DMSO 10 μ g/mL per 30 minuti.

Dopo aver eliminato tale soluzione sono stati addizionati 100 μL di H_2O_2 . Dopo 30 minuti, eliminata H_2O_2 , sono stati aggiunti 100 μL di medium senza siero e senza rosso fenolo. L'intensità di emissione è stata determinata a 535 nm in seguito ad eccitazione a 485 nm, utilizzando un lettore di piastre multipozzetto (VICTOR3 V™ Multilabel Counter, Perkin Elmer).

L'attività antiossidante intracellulare è stata espressa come percentuale di inibizione delle ROS intracellulari prodotte in seguito all'esposizione al perossido di idrogeno.

6.9 *Analisi della vitalità cellulare*

La vitalità cellulare è stata determinata mediante il saggio dell'MTT.

Il metodo si basa sulla riduzione, da parte delle cellule vitali, del 3-[4,5-dimetiltiazolo-2-il]-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT), di colore giallo, in un sale insolubile di formazano di colore blu (Figura 4.4).

L'MTT viene ridotto a formazano dalla succinato deidrogenasi, un enzima che appartiene alla catena respiratoria mitocondriale ed è attivo solo nelle cellule vitali.

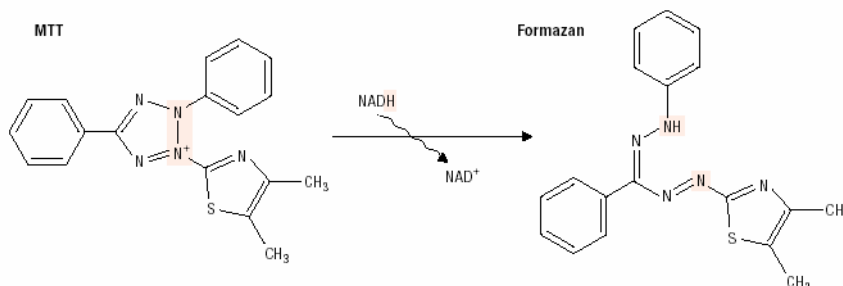


Figura 6.4: reazione intracellulare di formazione di formazano da MTT.

Per effettuare il saggio, è stata preparata una soluzione stock di MTT 5 mg/mL in PBS sterile, conservata a -20°C .

Dalle cellule, seminate in piastre da 96 pozzetti, è stato eliminato il medium e sostituito con una soluzione di medium contenente MTT 0.5 mg/mL.

Successivamente le cellule sono state poste in incubatore per un'ora. E' stato quindi rimosso il medium contenente MTT per

aggiungere DMSO, con il duplice effetto di lisare le cellule e solubilizzare i cristalli di formazano formati.

L'assorbanza di questa soluzione è stata rilevata a 595 nm, utilizzando un lettore di piastre multipozzetto (VICTOR3 V™ Multilabel Counter, Perkin Elmer). La vitalità è stata espressa come percentuale rispetto ai valori di assorbanza ottenuti per le cellule controllo.

7.1 Effetto del sulforafane sull'espressione ed attività degli enzimi detossificanti di fase 2 in cardiomiociti in coltura

Numerosi studi hanno evidenziato la capacità di SF di indurre enzimi detossificanti di fase 2 in diversi modelli cellulari. Poiché, ad oggi non sono stati riportati studi relativi all'effetto di SF in cellule cardiache, primo obiettivo della sperimentazione è stato valutare l'effetto della trattamento con SF (5 μ M), per tempi differenti (6, 12, 24 e 48 h), sull'espressione ed attività dei principali enzimi detossificanti di fase 2 (GST, GR, GPx, NQO1, TR), utilizzando come modello sperimentale colture primarie di cardiomiociti neonatali di ratto.

7.1.1 Glutathione S-Transferasi

In figura 7.1 sono riportati i livelli di mRNA, ottenuti tramite RT-PCR, della GST in colture di cardiomiociti trattate con SF 5 μ M per 30 min, - 48 ore. Si può notare un incremento dei livelli di espressione del gene che codifica per la GST solo dopo 3 ore di trattamento. Questa up-regolazione si mantiene ai tempi successivi, risultando massima dopo 48h.

In figura 7.2 sono riportate l'attività ed i livelli di espressione della GST, valutata tramite analisi immunoblotting, in colture di cardiomiociti trattate con SF 5 μ M per 6 - 48 ore. Dopo 6 e 12 ore di trattamento con SF, l'attività dell'enzima (fig 7.2b) non è risultata significativamente differente rispetto a quella misurata in cellule controllo. Solo dopo 24 e 48 ore di trattamento si è evidenziato un significativo incremento dell'attività della GST. I risultati dell'analisi immunoblotting (fig 7.2a) seguono lo stesso andamento dell'attività enzimatica, anche se in questo caso è possibile osservare un'induzione della proteina già dopo 6h di trattamento.

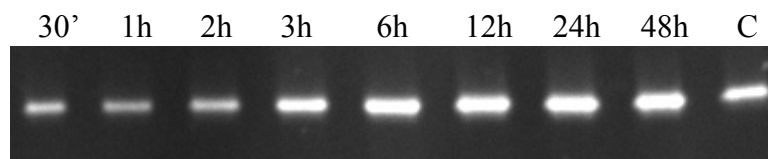


Figura 7.1: *Espressione genica di GST dopo trattamento con SF in colture di cardiomiociti. Le cellule sono state trattate con SF 5 μ M per 30min., 1, 2, 3, 6, 12, 24 e 48 ore. I livelli di mRNA sono stati valutati tramite analisi RT-PCR come riportato nel capitolo Materiali e metodi.*

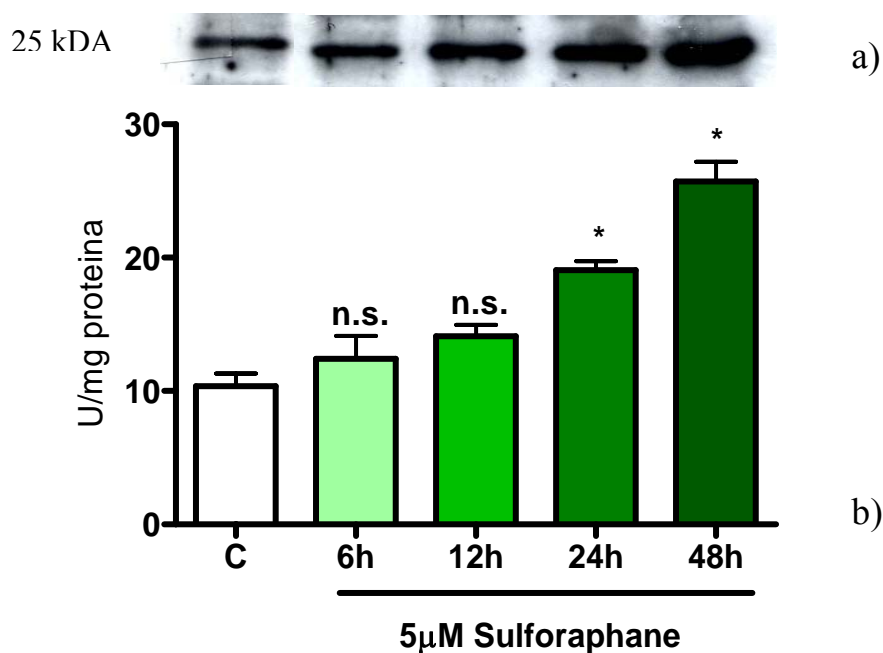


Figura 7.2: *Espressione proteica (a) ed attività (b) della GST dopo trattamento con SF in colture di cardiomiociti. Le cellule sono state trattate con SF 5 μ M per 6, 12, 24 e 48 ore. L'attività dell'enzima è stata valutata per via spettrofotometrica e l'espressione proteica tramite analisi immunoblotting come riportato nel capitolo Materiali e metodi. I dati riportati in figura (a) sono un esempio rappresentativo di tre esperimenti differenti, mentre i dati in figura (b) sono medie \pm DS di 5 esperimenti differenti. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita dal test di Dunnett come post-test, considerando significativi i valori inferiori a $p=0.05$ (*); n.s. = non significativo rispetto alle cellule controllo.*

7.1.2 *Glutathione Reduttasi*

In figura 7.3 sono riportati i livelli di mRNA, ottenuti tramite RT-PCR, della GR in colture di cardiomiociti trattate con SF 5 μ M per 30 min, 1 - 48 ore. A tempi brevi di esposizione SF non ha alcuna influenza sull'espressione del gene che codifica per la GR, mentre dopo 3 ore di trattamento si osserva un incremento dei livelli di mRNA che si mantiene fino alle 48 h, risultando massimo dopo 12 h.

In figura 7.4 sono riportate l'attività ed i livelli di espressione della GR, valutata tramite analisi immunoblotting, in colture di cardiomiociti trattate con SF 5 μ M per 6 - 48 ore. Dopo 6 e 12 ore di trattamento, l'attività dell'enzima (figura 7.4b) non è risultata significativamente differente rispetto a quella misurata in cellule controllo. Solo dopo 24 e 48 ore di trattamento si è evidenziato un significativo incremento dell'attività della GR. I risultati dell'analisi immunoblotting (fig 7.4a), sono in perfetto accordo con i dati dell'attività enzimatica. Anche in questo caso l'induzione è risulta massima dopo 48 h di trattamento.

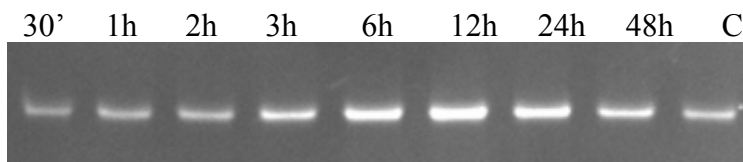


Figura 7.3: Espressione genica di GR dopo trattamento con SF in colture di cardiomiociti. Le cellule sono state trattate con SF 5 μ M per 30min, 1, 2, 3, 6, 12, 24 e 48 ore. I livelli di mRNA sono stati valutati tramite analisi RT-PCR come riportato nel capitolo Materiali e metodi.

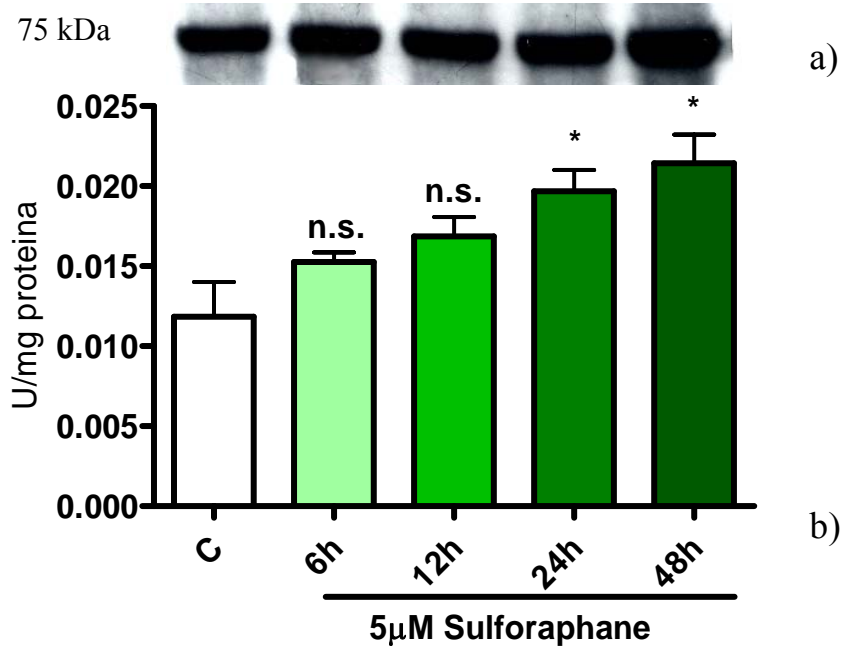


Figura 7.4: *Espressione proteica (a) ed attività (b) della GR dopo trattamento con SF in colture di cardiomiociti. Le cellule sono state supplementate con SF 5 μ M per 6, 12, 24 e 48 ore. L'attività dell'enzima (b) è stata valutata per via spettrofotometrica, e l'espressione proteica (a) tramite analisi immunoblotting come riportato nel capitolo Materiali e metodi. La figura (a) è un esempio rappresentativo di tre esperimenti differenti, mentre i dati in figura (b) sono medie \pm DS di 5 esperimenti differenti. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita dal test di Dunnett come post-test, considerando significativi i valori inferiori a $p=0.05$ (*); n.s. = non significativo rispetto alle cellule controllo.*

7.1.3 *Glutathione perossidasi*

In figura 7.5 sono riportati i livelli di mRNA, ottenuti tramite RT-PCR, della GPx in colture di cardiomiociti trattate con SF 5 μ M per 30 min, 1 - 48 ore. Diversamente da quanto osservato per la GST e la GR, il trattamento con SF non influenza la trascrizione del gene che codifica per la GPx a nessuno dei tempi considerati.

Anche l'attività enzimatica (figura 7.6b) ed i livelli di espressione dell'enzima (figura 7.6a), valutati tramite analisi immunoblotting, non vengono influenzati dal trattamento con SF a nessuno dei tempi presi in considerazione

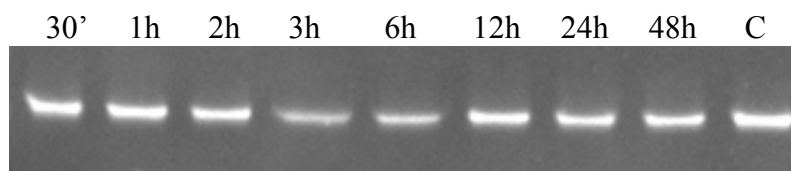


Figura 7.5: Espressione genica di GPx dopo trattamento con SF in colture di cardiomiociti. Le cellule sono state supplementate con SF 5 μ M per 30min, 1, 2, 3, 6, 12, 24 e 48 ore. I livelli di mRNA sono stati valutati tramite analisi RT-PCR come riportato nel capitolo Materiali e metodi.

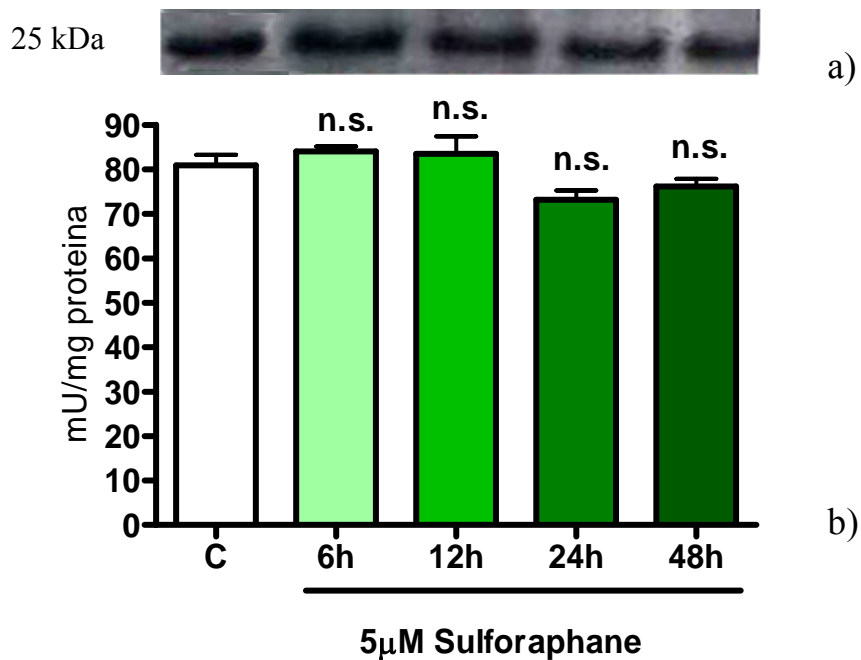


Figura 7.6: Espressione proteica (a) ed attività (b) della GPx dopo trattamento con SF in colture di cardiomiociti. Le cellule sono state supplementate con SF 5 μ M per 6, 12, 24 e 48 ore. L'attività dell'enzima (b) è stata valutata per via spettrofotometrica e l'espressione proteica (a) tramite analisi immunoblotting come riportato nel capitolo Materiali e metodi. La figura (a) è un esempio rappresentativo di tre esperimenti differenti, mentre i dati in figura (b) sono medie \pm DS di 5 esperimenti differenti. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita dal test di Dunnett come post-test, n.s. = non significativo rispetto alle cellule controllo.

7.1.4 NAD(P)H: chinone ossidoreduttasi 1

In figura 7.7 sono riportati i livelli di mRNA, ottenuti tramite RT-PCR, della NQO1 in colture di cardiomiociti trattate con SF 5 μ M per 30 min, 1 - 48 ore. Si può notare un incremento dei livelli di espressione del gene che codifica per la NQO1 già a dopo 1 ora di trattamento. Questa up-regolazione si mantiene ai tempi successivi, risultando massima dopo 48h.

In figura 7.8 sono riportate l'attività ed i livelli di espressione della NQO1, valutati tramite analisi immunoblotting, in colture di cardiomiociti trattate con SF 5 μ M per 6 - 48 ore. Diversamente da quanto emerso dai dati dell'espressione genica, l'attività enzimatica (fig 7.8b) è risultata significativamente incrementata rispetto a quella delle cellule controllo solo dopo almeno 12 h di trattamento. In particolare, è emersa una relazione statisticamente significativa ($r^2=0.9335$, $p<0.0001$) tra attività enzimatica e tempo di supplementazione. I dati dell'analisi immunoblotting (fig 7.8) seguono lo stesso andamento dell'attività enzimatica.

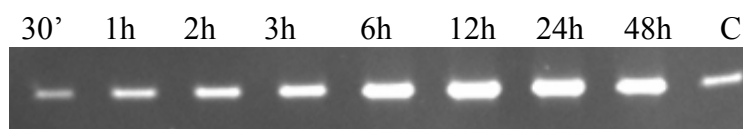


Figura 7.7: Espressione genica di NQO1 dopo trattamento con SF in colture di cardiomiociti. Le cellule sono state supplementate con SF 5 μ M per 30mi., 1, 2, 3, 6, 12, 24 e 48 ore. I livelli di mRNA sono stati valutati tramite analisi RT-PCR come riportato nel capitolo Materiali e metodi.

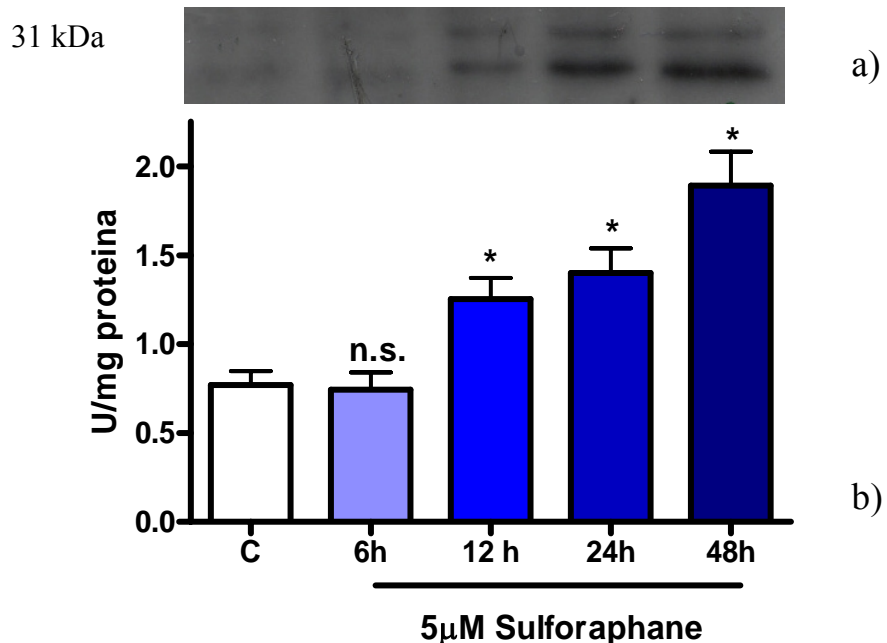


Figura 7.8: Espressione proteica (a) ed attività (b) della NQO1 dopo trattamento con SF in colture di cardiomiociti. Le cellule sono state supplementate con SF 5 μ M per 6, 12, 24 e 48 ore. L'attività dell'enzima (b) è stata valutata per via spettrofotometrica, e l'espressione proteica (a) tramite analisi immunoblotting come riportato nel capitolo Materiali e metodi. La figura (a) è un esempio rappresentativo di tre esperimenti differenti, mentre i dati in figura (b) sono medie \pm DS di 5 esperimenti differenti. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita dal test di Dunnett come post-test, considerando significativi i valori inferiori a $p=0.05$ (*); n.s. = non significativo rispetto alle cellule controllo.

7.1.5 *Tioredoxina reduttasi*

In figura 7.9 sono riportati i livelli di mRNA, ottenuti tramite RT-PCR, della TR in colture di cardiomiociti trattate con SF 5 μ M per 30 min, 1 - 48 ore. Si può notare un incremento dei livelli di espressione del gene che codifica per la TR già a partire da 2 ore di trattamento.

In figura 7.10 sono riportate l'attività, valutata con un saggio spettrofotometrico, ed i livelli di espressione della TR, valutati tramite analisi immunoblotting, in colture di cardiomiociti trattate con SF 5 μ M per 6 - 48 ore. A partire dalle 12 h di trattamento l'attività dell'enzima (fig 7.8b) è risultata significativamente aumentata rispetto a quella delle cellule controllo. I risultati dell'analisi immunoblotting (fig 7.8a) confermano i dati dell'attività dell'enzima, anche se un lieve incremento dell'espressione della proteina è osservabile anche dopo 6 h di trattamento con SF.

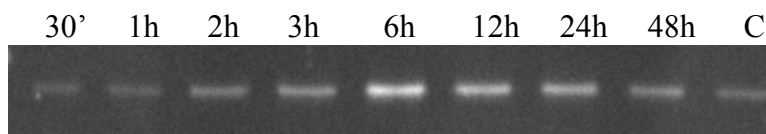


Figura 7.9: *Espressione genica di TR dopo trattamento con SF in colture di cardiomiociti. Le cellule sono state supplementate con SF 5 μ M per 30min, 1, 2, 3, 6, 12, 24 e 48 ore. I livelli di mRNA sono stati valutati tramite analisi RT-PCR come riportato nel capitolo Materiali e metodi.*

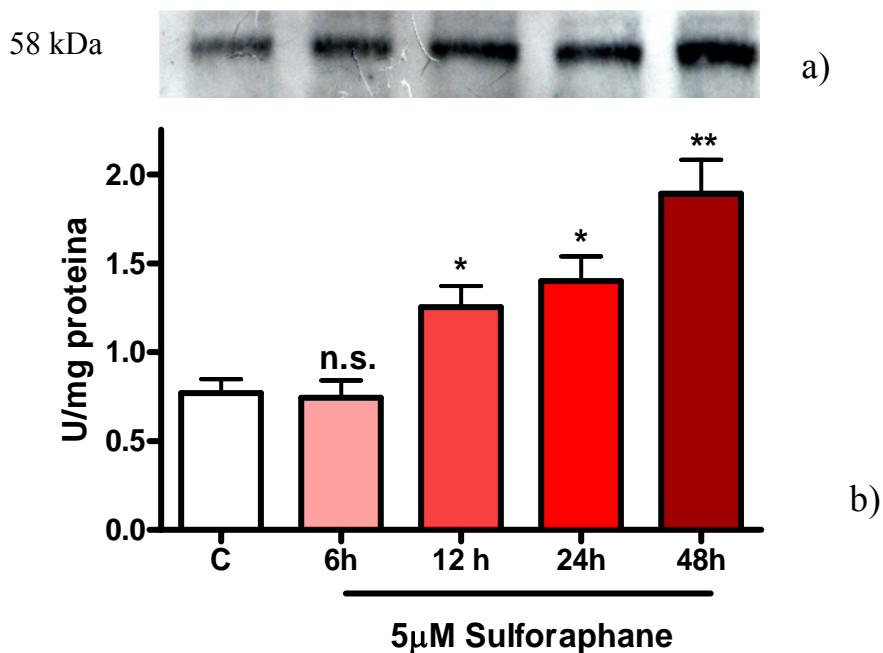


Figura 7.10: Espressione proteica (a) ed attività (b) della TR dopo trattamento con SF in colture di cardiomiociti. Le cellule sono state supplementate con SF 5 μ M per 6, 12, 24 e 48 ore. L'attività dell'enzima (b) è stata valutata per via spettrofotometrica, e l'espressione proteica (a) tramite analisi immunoblotting come riportato nel capitolo Materiali e metodi. La figura (a) è un esempio rappresentativo di tre esperimenti differenti, mentre i dati in figura (b) sono medie \pm DS di 5 esperimenti differenti. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita dal test di Dunnett come post-test, (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, n.s. = non significativo rispetto alle cellule controllo.

7.1.6 Attività della superossido dismutasi

In figura 7.11 è riportata l'attività della SOD in colture di cardiomiociti trattate con SF 5 μ M per 6 - 48 ore. Dall'analisi statistica non è emersa alcuna differenza significativa tra le cellule trattate con SF per tempi diversi e le cellule controllo.

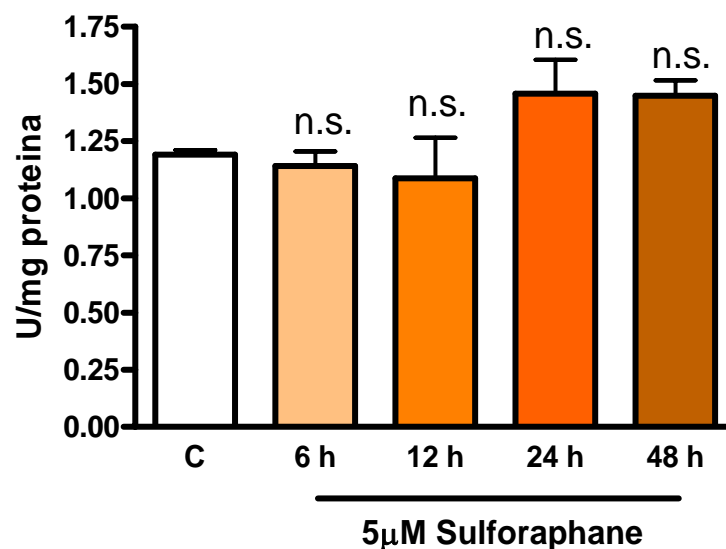


Figura 7.11: Attività della SOD dopo trattamento con SF in colture di cardiomiociti. Le cellule sono state supplementate con SF 5 μ M per 6, 12, 24 e 48 ore. L'attività dell'enzima è stata valutata per via spettrofotometrica come riportato nel capitolo Materiali e metodi. I dati riportati in figura sono medie \pm DS di 5 esperimenti differenti. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita dal test di Dunnett come post-test, n.s. = non significativo rispetto alle cellule controllo.

7.1.7 Attività della catalasi

In figura 7.12 è riportata l'attività della CAT in colture di cardiomiociti supplementate con SF 5 μ M per 6 - 48 ore. Dopo 24 e 48 h di trattamento con SF l'attività della SOD è risultata significativamente superiore rispetto a quella misurata nelle cellule controllo, mentre il trattamento per tempi più brevi non ha avuto alcuna influenza su questo parametro.

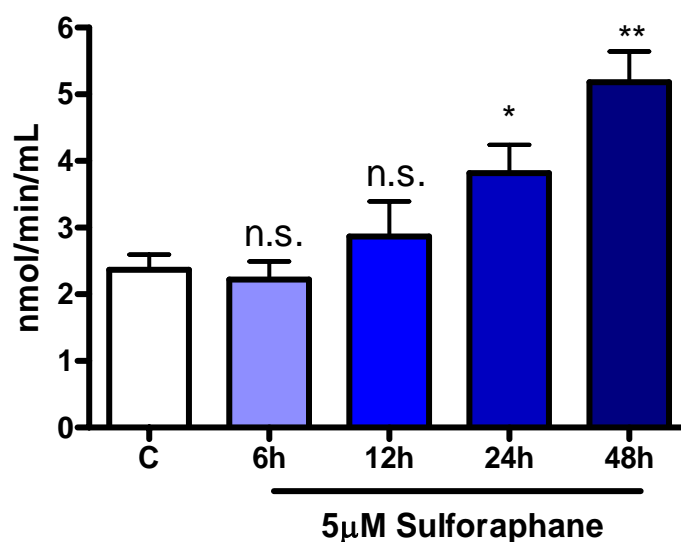


Figura 7.12: Attività della CAT dopo trattamento con SF in colture di cardiomiociti. Le cellule sono state supplementate con SF 5 μ M per 6, 12, 24 e 48 ore. L'attività dell'enzima è stata valutata per via spettrofotometrica come riportato nel capitolo Materiali e metodi. I dati riportati in figura sono medie \pm DS di 5 esperimenti differenti. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita dal test di Dunnett come post-test, n.s. = non significativo, * p <0.05, ** p <0.01 rispetto alle cellule controllo.

7.1.8 Contenuto intracellulare di Glutazione ridotto (GSH)

In figura 7.13 sono riportati i livelli di GSH intracellulari, misurati utilizzando la sonda fluorescente MCB, in colture di cardiomiociti trattate con SF 5 μ M per 6 - 48 ore.

In accordo con quanto emerso dall'analisi dei dati relativi alle attività degli enzimi legati al metabolismo del GSH, SF è stato in grado di incrementare i livelli di GSH intracellulare rispetto alle cellule controllo dopo almeno 12 ore di trattamento.

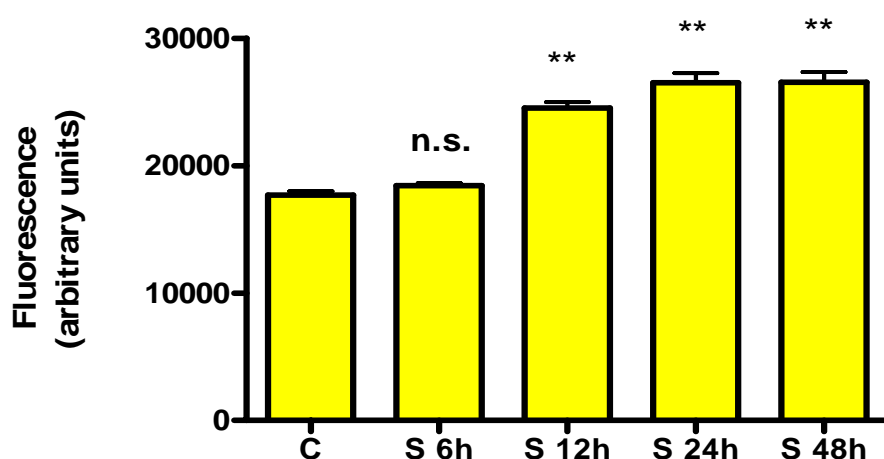


Figura 7.13: Livelli di GSH intracellulare dopo trattamento con SF in colture di cardiomiociti. Le cellule sono state supplementate con SF 5 μ M per 6, 12, 24 e 48ore e i livelli di GSH sono stati valutati per via spettrofluorimetrica come riportato nel capitolo Materiali e metodi. I dati sono medie \pm DS di 5 esperimenti differenti. L'analisi statistica è stata eseguita l'analisi della varianza (ANOVA) ad una via seguita dal test di Dunnett come post-test; (***) $p < 0.01$; n.s. = non significativo rispetto alle cellule controllo.

7.1.9 Produzione di ROS

Per verificare se all'incremento di attività degli enzimi detossificanti - antiossidanti di fase 2 corrisponda una miglior capacità della cellula di rispondere allo stress ossidativo, è stata valutata la formazione di ROS tramite il saggio spettrofluorimetrico della DCHF-DA.

In figura 7.14 è riportata la formazione di ROS in colture di cardiomiociti trattate con SF 5 μM per 6 - 48 ore ed esposte a H_2O_2 100 μM per 30 min. Le intensità di fluorescenza ottenute con cellule non trattate con SF ed esposte a H_2O_2 sono state poste uguali a 100 e gli altri valori calcolati in percentuale rispetto a questi. Il trattamento con SF per 6 ore ha mantenuto i livelli delle ROS a valori paragonabili a quelli osservati in cellule non trattate, mentre ai tempi più lunghi di esposizione, SF è stato in grado di ridurre significativamente i livelli delle ROS rispetto alle cellule non trattate.

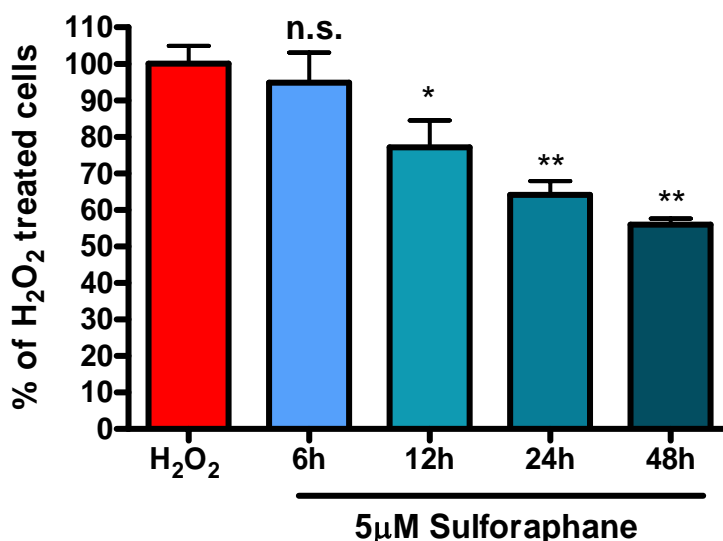


Figura 7.14: misura della produzione di ROS in colture di cardiomiociti supplementate con SF. Le cellule sono state supplementate con SF 5 μM per 6, 12, 24 e 48 ore. Al termine di ciascun trattamento le cellule sono state esposte ad H_2O_2 10 μM per 30 minuti e la produzione intracellulare di ROS è stata valutata utilizzando DCFH-DA come riportato nel capitolo Materiali e metodi. I dati sono medie \pm DS di 5 esperimenti differenti. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita dal test di Dunnett come post-test; considerando significativi i valori inferiori a $p=0.05$ (*), $(**)$ $p<0.01$; n.s.=non significativo rispetto alle cellule controllo.

7.1.10 Vitalità cellulare

In figura 7.15 è riportata la vitalità cellulare in colture di cardiomiociti trattati con SF per 6 - 48 ore, e successivamente esposti a H_2O_2 100 μM per 30 minuti. Nelle cellule non trattate con SF l'esposizione a H_2O_2 ha determinato una riduzione significativa della vitalità cellulare di circa il 60 %. Il trattamento con SF per 12 e 24 ore ha incrementato in modo significativo la vitalità cellulare rispetto alle cellule esposte ad H_2O_2 mentre la vitalità è rimasta significativamente minore rispetto a quella misurata nelle cellule controllo. Al contrario, il trattamento con SF per 48 ore è stato in grado di mantenere la vitalità cellulare a valori paragonabili a quelli ottenuti in cellule controllo.

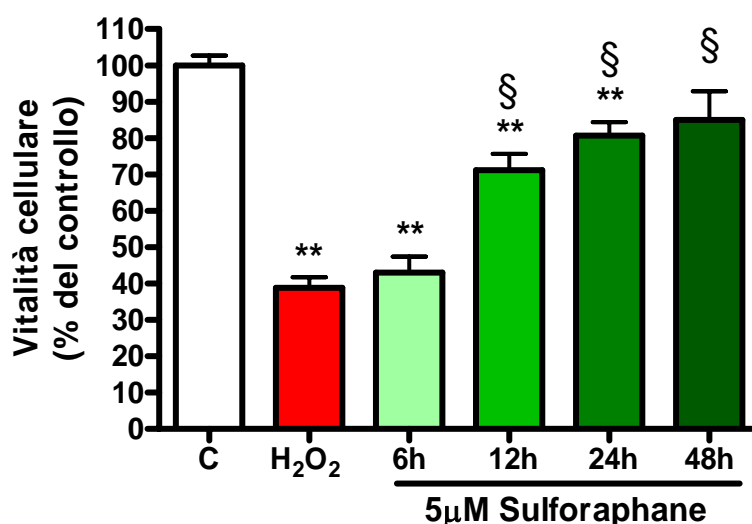


Figura 7.15: Vitalità cellulare di cardiomiociti supplementati con SF in presenza/assenza di H_2O_2 . Le cellule sono state supplementate con SF 5 μM per 6, 12, 24 e 48 ore. Al termine di ciascun trattamento le cellule sono state esposte ad H_2O_2 100 μM per 30 minuti e la vitalità cellulare valutata con il test del MTT come riportato nel capitolo Materiali e metodi. I dati sono medie \pm DS di 5 esperimenti differenti. L'analisi statistica è stata eseguita l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita dal test di Bonferroni come post-test, (**) $p < 0.01$ rispetto alle cellule controllo, (§) $p < 0.01$ rispetto alle cellule trattate con H_2O_2 .

7.2 Effetto del sulforafane sulle attività degli enzimi detossificanti/antiossidanti nel tessuto muscolare di ratti sottoposti ad esercizio fisico acuto ad esaurimento.

Ulteriore obiettivo è stato quello di valutare la capacità di una somministrazione intraperitoneale di SF (25 mg/kg p.c.) di proteggere il tessuto muscolare dallo stress ossidativo indotto, nel ratto, da un esercizio fisico acuto ad esaurimento.

A tale scopo, come precedentemente riportato, sono state valutate negli omogenati muscolari le attività dei principali enzimi detossificanti/antiossidanti.

7.2.1 *Glutathione S-Transferasi*

In figura 7.16 è riportata l'attività della GST nei diversi gruppi di animali trattati con SF 25 mg/kg p.c. e sottoposti ad una sessione di esercizio acuto ad esaurimento, come descritto nel capitolo Materiali e metodi.

Si può notare come il solo gruppo S presenti una attività dell'enzima GST significativamente superiore rispetto agli altri gruppi.

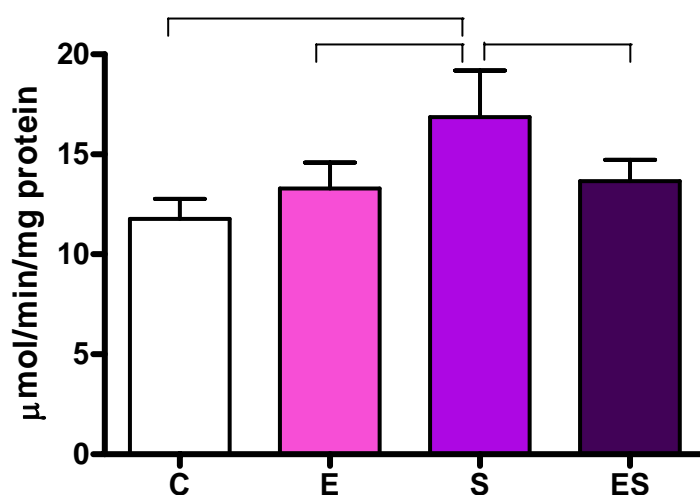


Figura 7.16: *Attività della GST nei gruppi di animali sottoposti ad esercizio (E), alla sola somministrazione di SF (S) e ad esercizio e somministrazione di SF (ES). L'attività dell'enzima è stata valutata attraverso un saggio spettrofotometrico come riportato nel capitolo Materiali e metodi. I dati riportati in figura sono medie \pm DS di 8 ratti per ciascun gruppo. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita dal test di Bonferroni come post-test; le barre orizzontali indicano le coppie di gruppi che presentano differenze significative, considerando significativi i valori inferiori a $p=0.05$.*

7.2.2 *Glutathione reduttasi*

In figura 7.17 è riportata l'attività della GR nei diversi gruppi di animali trattati con SF 25 mg/kg p.c. e sottoposti ad una sessione esercizio acuto ad esaurimento, come descritto nel capitolo Materiali e metodi. Si può notare come l'attività della GR nei gruppi trattati con SF 25 mg/kg p.c. risulti significativamente aumentata rispetto al gruppo sottoposto al solo esercizio.

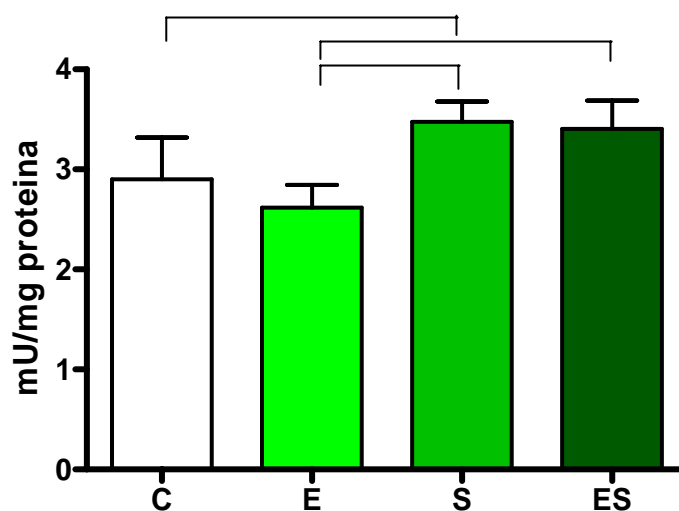


Figura 7.17: *Attività della GR nei gruppi di animali sottoposti ad esercizio (E), alla sola somministrazione di SF (S) e ad esercizio e somministrazione di SF (ES). L'attività dell'enzima è stata valutata attraverso un saggio spettrofotometrico come riportato nel capitolo Materiali e metodi. I dati riportati in figura sono medie \pm DS di 8 ratti per ciascun gruppo. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita dal test di Bonferroni come post-test; le barre orizzontali indicano le coppie di gruppi che presentano differenze significative, considerando significativi i valori inferiori a $p=0.05$.*

7.2.3 *Glutathione perossidasi*

In figura 7.18 è riportata l'attività della GPx nei diversi gruppi di animali trattati con SF 25 mg/kg p.c. e sottoposti ad una sessione di esercizio acuto ad esaurimento, come descritto nel capitolo Materiali e metodi. Si può notare come per quanto riguarda l'attività della GPx non vi siano differenze significative tra i diversi gruppi.

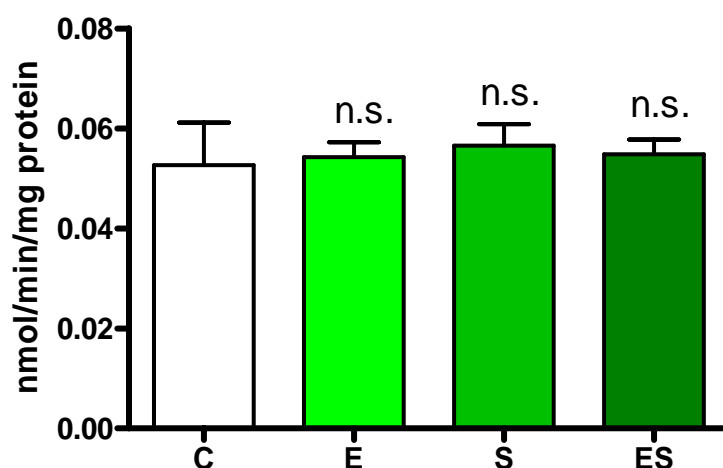


Figura 7.18: *Attività della GPx nei gruppi di animali sottoposti ad esercizio (E), alla sola somministrazione di SF (S) e ad esercizio e somministrazione di SF (ES). L'attività dell'enzima è stata valutata attraverso un saggio spettrofotometrico come riportato nel capitolo Materiali e metodi. I dati riportati in figura sono medie \pm DS di 8 ratti per ciascun gruppo. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita dal test di Bonferroni come post-test; n.s. = non significativo.*

7.2.4 NADPH chinone ossidoreduttasi 1

In figura 7.19 è riportata l'attività della NQO1 nei diversi gruppi di animali trattati con SF 25 mg/kg p.c. e sottoposti ad un esercizio acuto ad esaurimento, come descritto nel capitolo Materiali e metodi. Si può notare come l'attività della NQO1 presenti numerose differenze tra i gruppi. I ratti del gruppo E, sottoposti al solo esercizio fisico, presentano un'attività dell'enzima significativamente inferiore rispetto a tutti gli altri gruppi compreso quello di controllo. I ratti del gruppo S, sottoposti al solo trattamento con SF 25 mg/kg p. c. risultano presentare una più elevata attività dell'enzima anche se non significativamente superiore a quella del gruppo di controllo, mentre i ratti del gruppo ES sottoposti sia all'esercizio fisico sia al trattamento con SF 25 mg/kg p.c. presentano un'attività intermedia tra quelli del gruppo E e del gruppo S.

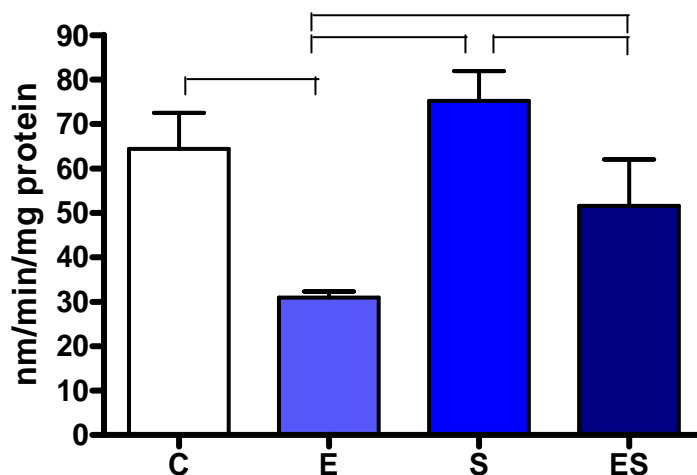


Figura 7.19: Attività della NQO1 nei gruppi di animali sottoposti ad esercizio (E), alla sola somministrazione di SF (S) e ad esercizio e somministrazione di SF (ES). L'attività dell'enzima è stata valutata attraverso un saggio spettrofotometrico come riportato nel capitolo Materiali e metodi. I dati riportati in figura sono medie \pm DS di 8 ratti per ciascun gruppo. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita dal test di Bonferroni come post-test; le barre orizzontali indicano le coppie di gruppi che presentano differenze significative, considerando significativi i valori inferiori a $p=0.05$.

7.2.5 Tioredoxina reduttasi

In figura 7.20 è riportata l'attività della TR nei diversi gruppi di animali trattati con SF 25 mg/kg p.c. e sottoposti ad un esercizio acuto ad esaurimento, come descritto nel capitolo Materiali e metodi. Si può notare come l'attività della TR non presenti differenze significative tra i vari gruppi.

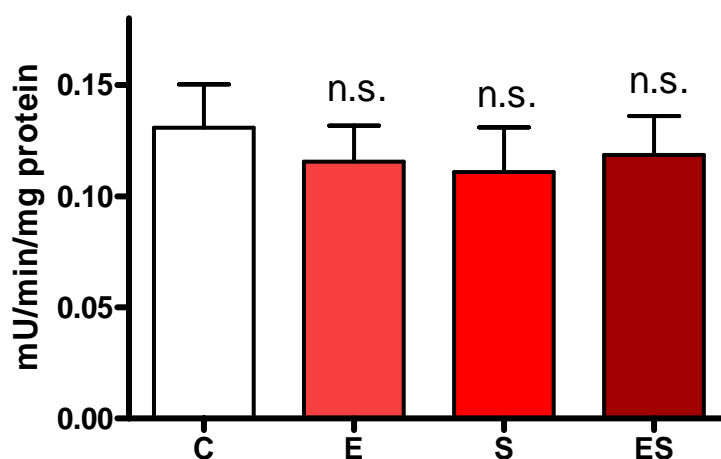


Figura 7.18: Attività della TR nei gruppi di animali sottoposti ad esercizio (E), alla sola somministrazione di SF (S) e ad esercizio e somministrazione di SF (ES). L'attività dell'enzima è stata valutata attraverso un saggio spettrofotometrico come riportato nel capitolo Materiali e metodi. I dati riportati in figura sono medie \pm DS di 8 ratti per ciascun gruppo. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita dal test di Bonferroni come post-test; n.s. = non significativo.

7.2.6 Superossido dismutasi

In figura 7.21 è riportata l'attività della SOD nei diversi gruppi di animali trattati con SF 25 mg/kg p.c. e sottoposti ad un esercizio acuto ad esaurimento, come descritto nel capitolo Materiali e metodi. Si può notare come i ratti dei gruppi sottoposti ad esercizio, gruppi E ed ES, presentino un'attività della SOD significative inferiore rispetto agli altri gruppi.

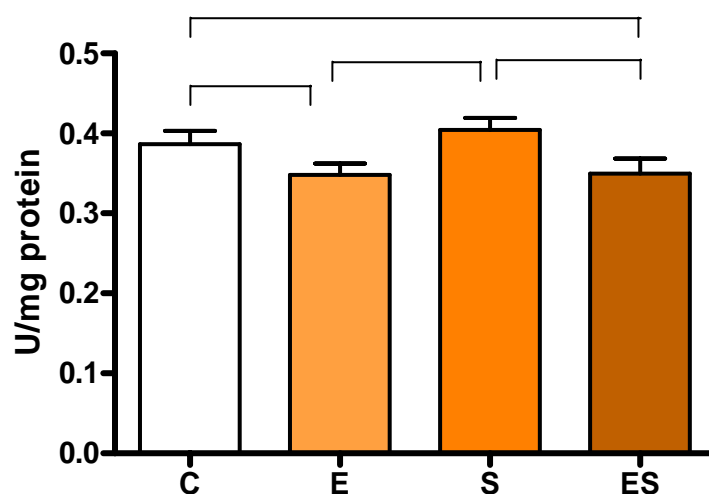


Figura 7.21: Attività della SOD nei gruppi di animali sottoposti ad esercizio (E), alla sola somministrazione di SF (S) e ad esercizio e somministrazione di SF (ES). L'attività dell'enzima è stata valutata attraverso un saggio spettrofotometrico come riportato nel capitolo Materiali e metodi. I dati riportati in figura sono medie \pm DS di 8 ratti per ciascun gruppo. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita dal test di Bonferroni come post-test; le barre orizzontali indicano le coppie di gruppi che presentano differenze significative, considerando significativi i valori inferiori a $p=0.05$.

7.2.7 Catalasi

In figura 7.22 è riportata l'attività della CAT nei diversi gruppi di animali trattati con SF 25 mg/kg p.c. e sottoposti ad un esercizio acuto ad esaurimento, come descritto nel capitolo Materiali e metodi. Si può notare come per quanto riguarda l'attività della CAT non vi siano differenze significative tra i diversi gruppi.

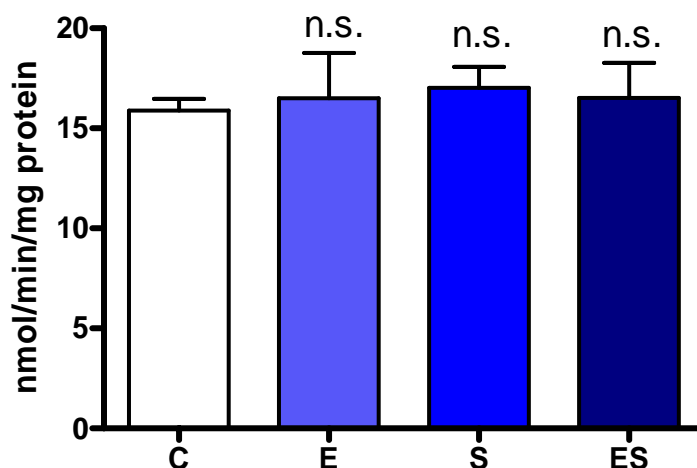


Figura 7.22: Attività della CAT nei gruppi di animali sottoposti ad esercizio (E), alla sola somministrazione di SF (S) e ad esercizio e somministrazione di SF (ES). L'attività dell'enzima è stata valutata attraverso un saggio spettrofotometrico come riportato nel capitolo Materiali e metodi. I dati riportati in figura sono medie \pm DS di 8 ratti per ciascun gruppo. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita dal test di Bonferroni come post-test; n.s. = non significativo.

7.2.8 Lattico deidrogenasi

Per verificare se il trattamento con SF possa proteggere i tessuti muscolari dai danneggiamenti che occorrono in seguito ad esercizio fisico intenso sono stati valutati i livelli plasmatici di LDH, come marker di danno tissutale.

In figura 7.23 sono riportati i livelli della LDH nei diversi gruppi di animali trattati con SF 25 mg/kg p.c. e sottoposti ad un esercizio acuto ad esaurimento. I risultati mostrano come i ratti dei gruppi S ed ES, trattati con SF 25 mg/kg p.c., presentano un'attività plasmatica dell'enzima LDH significativamente inferiore a quella dei ratti del gruppo E e psragonsbile a quella dei ratti del gruppo controllo (C) che non hanno svolto alcun tipo di esercizio fisico.

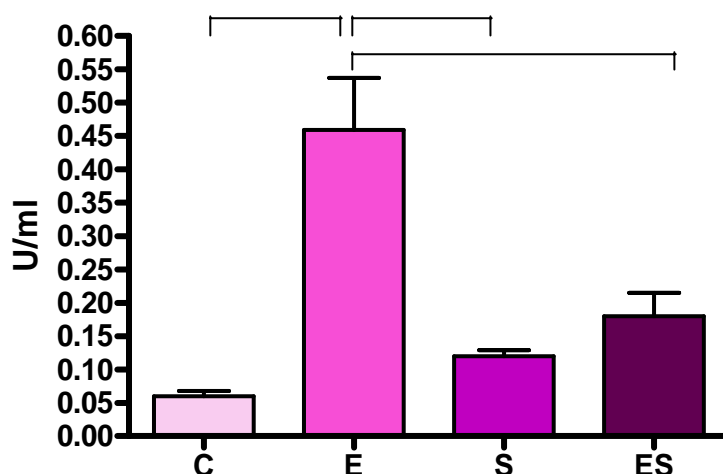


Figura 7.23: Attività plasmatica della LDH nei gruppi di animali sottoposti ad esercizio (E), alla sola somministrazione di SF (S) e ad esercizio e somministrazione di SF (ES). L'attività dell'enzima è stata valutata attraverso un saggio spettrofotometrico come riportato nel capitolo Materiali e metodi. I dati riportati in figura sono medie \pm DS di 8 ratti per ciascun gruppo. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita dal test di Bonferroni come post-test; le barre orizzontali indicano le coppie di gruppi che presentano differenze significative, considerando significativi i valori inferiori a $p=0.05$

Capitolo 8 Discussione

Numerosi studi scientifici hanno evidenziato che lo stress ossidativo riveste un ruolo di primaria importanza nello sviluppo di diverse patologie tra cui: malattie cardiovascolari quali danno da ischemia e riperfusione, aterosclerosi e cardiotoxicità indotta da composti chimici (*Kang, 2003; Stoker et al., 2004; Molavi et al., 2004*), patologie neurodegenerative quali morbo di Parkinson e morbo di Alzheimer (*Di Napoli et al., 2007; Swerdlow 2007*) e diverse tipologie di cancro (*Fusco et al., 2007*).

Da alcuni anni le Autorità sanitarie nazionali ed internazionali si stanno impegnando nel promuovere tra la popolazione generale stili di vita ed abitudini che possano contribuire a prevenire e ridurre l'incidenza di queste patologie, ciò contribuirebbe a migliorare sia la qualità della vita sia, probabilmente, a ridurre la spesa pubblica. Tra i principali interventi, in Italia, possiamo ricordare la *campagna "5 a day"* promossa dalla WHO e ripresa dal Ministero della Salute, volta a sottolineare l'importanza di una corretta alimentazione e favorire il consumo di prodotti ricchi di micronutrienti antiossidanti, ed a richiamare la popolazione sull'importanza di un'attività fisica moderata in tutte le fasce di età.

8.1 *Effetto di SF sugli enzimi detossificanti/antiossidanti e sua protezione nei confronti del danno indotto da stress ossidativo nella cellula cardiaca*

A livello del miocardio le ROS vengono generate nei miociti, nelle cellule endoteliali e nei neutrofili. Potenziali fonti di ROS nei cardiomiociti sono: la catena di trasporto mitocondriale degli elettroni, la NADPH ossidasi e il sistema xantina ossidasi/deidrogenasi (*Moon et al., 2003*). Una delle prove più significative del coinvolgimento delle ROS nella patogenesi delle malattie cardiovascolari è la capacità di vari composti, non correlati dal punto di vista strutturale, di fornire protezione verso tali patologie, grazie alle loro proprietà antiossidanti (*Griendling et al., 2003*).

SF, un isotiocianato presente nei vegetali appartenenti alla famiglia delle Crocifere, viene prodotto a seguito dell'idrolisi del glucosinolato glucorafanina ad opera dell'enzima tioglucoside glucoidrolasi (*Gamet-Payraastre et al., 1998*). Negli ultimi anni è stata rivolta una notevole attenzione a SF nel settore della ricerca nutrizionale. Molti studi hanno,

infatti, evidenziato una correlazione inversa tra l'assunzione di Crucifere ed il rischio di alcune forme di cancro e questa associazione è risultata maggiore rispetto a quella tra il rischio di cancro e l'assunzione di frutta e verdura in generale. SF si è dimostrato efficace nel bloccare l'iniziazione e la progressione della carcinogenesi indotta da diversi composti chimici in modelli animali (*Fahey et al., 1997*). Questi effetti sono stati inizialmente attribuiti alla modulazione del metabolismo delle sostanze cancerogene dovuta ad un'induzione degli enzimi detossificanti di fase 2 e dei livelli di glutatione (*Gerhauser et al., 1997*).

Poichè, ad oggi, non esistono studi sugli effetti di SF a livello del muscolo cardiaco, il primo obiettivo della ricerca oggetto di questa tesi è stato valutare sia l'effetto modulatorio di SF nei confronti degli enzimi di fase 2 sia il potenziale effetto cardioprotettivo di SF nei confronti del danno indotto da stress ossidativo.

Come modello sperimentale sono state utilizzate colture primarie di cardiomiociti di ratti neonati. In particolare sono stati valutati gli effetti di SF sull'espressione e sull'attività dei principali enzimi detossificanti di fase 2 quali GST, GR, GPx, TR e NQO1, e sull'attività degli enzimi antiossidanti, SOD e CAT, coinvolti nell'azione di scavenging del $O_2^{\cdot-}$. Inoltre è stato valutato il contenuto di GSH ridotto intracellulare, mentre per verificare se l'incremento di attività ed espressione degli enzimi detossificanti/antiossidanti determinasse una maggiore resistenza della cellula allo stress ossidativo, sono state valutate la produzione di ROS e la vitalità cellulare.

Il GSH e gli enzimi ad esso correlati è uno dei più importanti sistemi antiossidanti endogeni non enzimatici (*Meister et al., 1983*). Si trova ubiquitariamente in tutti i tipi di cellule in concentrazione millimolare e viene sintetizzato enzimaticamente dalla glutammato-cisteina ligasi e dalla glutatione sintetasi (*Lu, 1998*). Esiste nella cellula sia in forma ridotta (GSH) sia in quella ossidata (GSSG). In condizioni redox fisiologiche prevale GSH, mentre in presenza di stress ossidativo GSH diminuisce ed aumenta GSSG. I risultati ottenuti in questo studio mostrano un significativo incremento del contenuto di GSH intracellulare dopo supplementazione con SF, indicando un chiaro ruolo di SF nel modulare lo stato redox cellulare. I nostri dati mostrano un incremento dei livelli di GSH a partire da 6 ore di trattamento mentre l'attività dell'enzima GR risulta indotta solo a tempi di trattamento maggiori. Questo dato indica che almeno parzialmente l'induzione dei livelli di GSH non è dovuta esclusivamente all'aumentata attività dell'enzima GR, responsabile della riconversione del GSSG a GSH, ma suggerisce il coinvolgimento di altri meccanismi come probabilmente l'induzione della glutammato-cisteina

ligasi, enzima che catalizza la tappa limitante nella sintesi di GSH, come peraltro indicato recentemente da *McWalter et al. (2007)*. Questi Autori hanno infatti dimostrato che l'assunzione dietetica di semi di broccoli determina un aumento dei livelli di glutammato-cisteina ligasi in topi *nrf2*^{+/+}, mentre in topi *nrf2*^{-/-} non si osserva alcuna variazione dei livelli di questo enzima, dimostrando così che SF non solo agisce favorendo la traslocazione di Nrf2 nel nucleo, ma anche che è alla base dell'incremento dei livelli di GSH intracellulari.

Il trattamento con SF, oltre a determinare un aumento della attività della GR, ha indotto anche l'espressione sia del gene che della proteina. L'induzione del gene GR precede di alcune ore l'aumento dell'espressione proteica che invece coincide esattamente con l'aumento dell'attività. Questi dati indicano quindi chiaramente che, a livello cardiaco, l'azione di SF porta ad un aumento dell'attività dovuto all'incremento effettivo della quantità di enzima, come peraltro indicato da studi condotti su altri modelli cellulari che hanno individuato nella liberazione di Nrf2 il meccanismo attraverso cui SF porta alla up regolazione dei principali meccanismi detossificanti endogeni.

Analogamente a quanto descritto per la GR, anche l'attività e l'espressione della GST sono state intensamente influenzate dal trattamento. GST è una proteina comunemente considerata come un enzima di fase 2, coinvolto prevalentemente nella detossificazione degli xenobiotici elettrofili (*Hayes et al., 1995; Strange et al., 2001*). Recentemente alcuni studi hanno individuato un coinvolgimento della GST anche nella detossificazione degli idroperossidi lipidici generati dallo stress ossidativo (*Xie et al., 2001*). In questo studio i dati indicano che SF ha la capacità di indurre l'espressione dell'isoforma GSTA1 della GST il che spiega l'aumento dell'attività di questo enzima traslato nel tempo di alcune ore rispetto all'aumento di mRNA e di proteina.

Nel nostro studio, l'attività, i livelli di mRNA, e la quantità di proteina della GPx non sono stati influenzati dal trattamento con SF a nessuno dei tempi considerati. Questo risultato è in accordo con quelli pubblicati da *Hu et al. (2007)* che hanno recentemente osservato che la GPx non è significativamente influenzata dal trattamento per 24h con SF a diverse concentrazioni. Anche altri Autori hanno raggiunto risultati analoghi, *Hintze et al. (2003)* hanno dimostrato che l'assunzione dietetica di SF aumenta l'espressione epatica della TR ma non della GPx. *Campbell et al. (2007)* hanno notato che SF è in grado di up-regolare GPx-1 solo se il terreno di coltura contiene contemporaneamente selenito alla concentrazione di 40nM. Il terreno di coltura da noi utilizzato non

conteneva alcuna supplementazione di selenito e ciò contribuisce a spiegare perché nel nostro studio la GPx non sia stata influenzata dal trattamento.

Trx è una piccola proteina che agisce da importante regolatore dello stato redox cellulare (*Nakamura et al., 1997*). La riduzione del sito attivo della Trx è catalizzata da TR utilizzando il NADPH come cofattore. Trx agisce, quindi, come scavenger delle ROS a livello cellulare (*Ago et al., 2006*). *Turoczi et al., (2003)* hanno dimostrato che topi che sovraesprimono la Trx a livello cardiaco presentano un miglior recupero ventricolare in seguito ad ischemia ed una riduzione delle dimensioni dell'area infartuata rispetto ai topi di controllo. È inoltre stato dimostrato che la sovraespressione della Trx a livello cardiaco previene l'ipertrofia cardiaca indotta dalla sovrastimolazione dei recettori adrenergici (*Kster et al., 2005*), suggerendo un ruolo protettivo della Trx nell'insufficienza cardiaca.

I dati ottenuti nel nostro studio indicano un'iniziale induzione dell'attività dell'enzima TR a partire dalle 12 ore di trattamento, induzione che risulta via via più intensa con l'aumentare del tempo di trattamento. In accordo con i dati ottenuti per l'attività della TR, anche i risultati relativi all'espressione di tale enzima mostrano sia un incremento dei livelli di mRNA sia un aumento della quantità di proteina indicando che l'aumento di attività è, anche in questo caso, dovuto ad un effettivo aumento di enzima attivo nella cellula. L'importante azione di SF sui livelli e l'attività di questo enzima ha quindi la fondamentale funzione di mantenere elevati i livelli intracellulari di Trx ridotta, contribuendo quindi al mantenimento del potenziale redox cellulare.

Numerosi Autori hanno dimostrato che anche l'enzima NQO1 è fortemente indotto in seguito a trattamento con SF. *Zhang et al. (2006)* hanno dimostrato che il trattamento con SF induce numerosi enzimi di fase 2, tra cui NQO1, a livello della vescica in un modello animale di ratto; un risultato analogo è stato ottenuto da *Ritz et al. (2007)* in un modello in vitro di cellule epiteliali. NQO1 è una flavoproteina, prevalentemente citoplasmatica, che attua la sua funzione detossificante agendo sui composti chinonici che vengono ridotti grazie ad un meccanismo di trasferimento di ioni idruro per generare il corrispondente derivato idrochinonico.

Nel nostro studio, analogamente a quanto descritto per gli enzimi precedenti, anche nel caso della NQO1 abbiamo notato un significativo incremento dell'attività dell'enzima a partire dalle 12 ore di trattamento. Anche in questo caso l'aumento della attività dell'enzima è accompagnato da un parallelo incremento dei livelli di mRNA e proteina, indicando quindi che SF, agendo a livello trascrizionale, porta all'aumento dell'attività della NQO1.

Alcuni recenti studi in vitro hanno dimostrato che il trattamento con xenobiotici induce in cellule nrf2^{+/+} gli enzimi antiossidanti SOD e CAT, mentre nelle stesse cellule nrf2^{-/-} lo stesso trattamento non induceva in alcun modo l'attività di questi enzimi, che rimaneva ai livelli basali, indicando che anche l'espressione genica di questi due importanti enzimi antiossidanti è, almeno in parte, indotta da Nrf2 (Zhu et al., 2005; Kwak et al., 2003). Sebbene in letteratura non siano presenti studi che abbiano valutato la capacità di SF di indurre SOD e CAT nel tessuto cardiaco, i dati ottenuti nel nostro studio mostrano che l'attività della CAT è fortemente indotta a partire da 24 ore di trattamento. Come accennato precedentemente, Zhu et al. (2005) hanno dimostrato che anche l'espressione della CAT è sotto il controllo di Nrf2. Essendo SF in grado di indurre la liberazione di Nrf2 dal legame con Keap1 (Hong et al., 2005) appare chiaro come il trattamento con SF possa indurre l'attività della CAT favorendo la traslocazione di Nrf2 al nucleo.

Al contrario lo stesso trattamento con SF non è stato in grado di stimolare significativamente l'attività della SOD, sebbene anche l'espressione di questo enzima sia, almeno in parte, sotto il controllo di Nrf2 (Zhu et al., 2005). Tuttavia, seppure non significativo, l'andamento dei nostri dati sembra indicare un leggero incremento dell'attività della SOD dopo 24 e 48 ore di trattamento. Data la carenza in letteratura di dati riguardo a questo argomento, i nostri studi futuri cercheranno di individuare se un trattamento più lungo possa indurre anche l'attività della SOD, così come i nostri dati sembrano suggerire, o se al contrario il trattamento con SF non sia sufficiente a stimolare l'attività di questo importante enzima antiossidante.

I risultati appena discussi dimostrano che SF possiede la capacità di up-regolare l'espressione e aumentare l'attività di numerosi enzimi detossificanti/antiossidanti come GSH, GR, GST, NQO1, TR e CAT. Questi enzimi rappresentano parte dell'insieme dei meccanismi di difesa cellulare nei confronti sia dello stress ossidativo sia di numerosi xenobiotici. Allo scopo di valutare se effettivamente l'induzione di questi enzimi da parte di SF sia in grado, o possa contribuire a difendere i cardiomiociti dallo stress ossidativo, abbiamo valutato la vitalità cellulare e i livelli di ROS in cellule stressate con H₂O₂ in seguito a trattamento per 6 – 48 ore con SF.

I dati da noi ottenuti mostrano molto chiaramente che il pretrattamento con SF è in grado di proteggere i cardiomiociti dallo stress citotossico indotto dalla H₂O₂ e dall'accumulo intracellulare di ROS.

È interessante notare come SF conferisca una parziale protezione ai cardiomiociti solo dopo 12 ore di trattamento, mentre a 48 ore tale

protezione risulti essere totale, dimostrando che SF esercita un effetto protettivo a lungo termine.

È noto che lo stress ossidativo e la citotossicità delle ROS sono tra i responsabili dei danni cardiaci che si osservano in seguito a fenomeni di ischemia e riperfusione, tanto che in seguito a questi fenomeni si osserva un aumento dei livelli delle ROS nei cardiomiociti (*Lefet et al., 2000; Molavi et al., 2004*). Nel nostro studio SF si è dimostrato capace di ridurre, a partire dalle 12 ore di trattamento, i livelli delle ROS nei cardiomiociti trattati con H₂O₂.

Come descritto nel capitolo *Materiali e metodi*, le colture di cardiomiociti utilizzate nella nostra ricerca sono state trattate con SF 5μM, concentrazione che può essere paragonata a quella plasmatica che si raggiunge in seguito all'assunzione dietetica di una porzione di broccoli (*Conaway et al., 2000, McNaughton et al., 2003*).

I nostri dati supportano pienamente le politiche volte a promuovere l'aumento di alimenti vegetali ricchi in antiossidanti e composti nutraceutici. SF, infatti, si propone come molecola importantissima in grado di esercitare cardioprotezione nei confronti del danno ossidativo a concentrazioni che si possono raggiungere attraverso una normale assunzione dietetica.

8.2 Effetto protettivo di SF nei confronti dello stress ossidativo indotto da esercizio fisico acuto ad esaurimento

L'allenamento aerobico moderato mantiene il trofismo del tessuto muscolare e di quello scheletrico, oltre che stimolare le difese antiossidanti endogene dell'organismo (*Ji et al., 2002; Gomez-Cabrera et al., 2008*). Al contrario, l'esercizio fisico rappresenta una grave fonte di stress ossidativo quando viene condotto ad alta intensità e senza un'adeguata preparazione. In una review *Vina et al. (Vina et al., 2000)* hanno, infatti, descritto come l'esercizio fisico ad esaurimento determini un significativo aumento dello stress ossidativo a livello muscolare soprattutto attraverso l'attivazione dell'enzima xantina ossidasi. Alcuni studi hanno indagato la possibilità di contrastare lo stress ossidativo che si genera durante un'attività acuta ad esaurimento, attraverso il trattamento con antiossidanti diretti, ma i risultati sono stati contrastanti e finora poco incoraggianti. *Liu et al. (2000)* hanno studiato tale possibilità somministrando licopene a ratti successivamente sottoposti ad esercizio fisico ad esaurimento; essi non hanno riscontrato

differenze tra i ratti sottoposti ad esercizio con o senza trattamento con licopene né a livello dell'attività di enzimi proossidanti come la XO né a livello di biomarcatori di danno muscolare come le attività plasmatiche di creatina chinasi (CK) e LDH. Anche in un recente studio è stato indagato se la supplementazione con vitamine C ed E possa prevenire l'insorgenza di danni muscolari in atleti sottoposti ad ultramaratona; gli Autori hanno notato che la supplementazione con vitamine C ed E non porta a nessuna variazione dell'attività plasmatica di CK e LDH rispetto agli atleti di controllo, sebbene determini un effettivo aumento dei livelli plasmatici delle vitamine stesse. Gli Autori hanno pertanto concluso che la somministrazione di vitamine antiossidanti sembra non avere effetti sulla prevenzione dei danni muscolari indotti dall'esercizio fisico (*Mastaloudis et al., 2006*).

Nello studio oggetto della seconda parte di questa tesi è stata indagata la possibilità di contrastare lo stress ossidativo, indotto dall'esercizio fisico acuto ad esaurimento, modulando l'attività delle difese antiossidanti endogene attraverso il trattamento, per via intraperitoneale, con SF, un antiossidante indiretto, in ratti Wistar maschi. Oltre a determinare l'attività dei principali enzimi detossificanti di fase 2 e dei principali enzimi antiossidanti è stata misurata l'attività plasmatica della LDH, al fine di valutare se il trattamento con SF possa proteggere i tessuti muscolari dalle lesioni che si verificano durante un esercizio fisico di questo tipo. I risultati ottenuti mostrano come i ratti trattati con SF, quelli appartenenti ai gruppi S ed ES, evidenzino un'attività della LDH significativamente inferiore rispetto ai ratti sottoposti al solo esercizio fisico, i ratti del gruppo E. Questo dato appare particolarmente incoraggiante, poiché dalla letteratura scientifica disponibile sembrano non essere ancora state individuate molecole antiossidanti in grado di prevenire o limitare i danni muscolari che si riscontrano, nei modelli sia animali sia umani, in seguito ad esercizio fisico estenuante. Sebbene questo dato necessiti di ulteriori conferme, si propone, quindi, come un potenziale agente in grado di limitare le lesioni muscolari indotte dall'esercizio fisico ad esaurimento.

Attualmente in letteratura non sono presenti studi che abbiano indagato gli effetti di un trattamento con SF a livello dei tessuti muscolari scheletrici; oggetto dello studio di questa tesi è stata quindi la valutazione degli effetti di un trattamento con SF a livello del tessuto muscolare di ratti sottoposti ad esercizio fisico ad esaurimento. Per quanto riguarda i risultati ottenuti a livello degli enzimi di fase 2 coinvolti nel ciclo redox del GSH si nota che il trattamento con SF aumenta, a livello muscolare, l'attività della GR e della GST rispetto ai ratti di controllo. Questo risultato, seppur non

ancora descritto a livello muscolare, è in accordo con altri studi che hanno già dimostrato sia in alcuni tessuti, sia in alcuni modelli cellulari, l'induzione di questi enzimi da parte del SF (*Hu et al., 2007; Zhang et al., 2006; Munday et al., 2004; Jiang et al., 2003*). Questo aumento di attività, osservato a riposo, si mantiene anche in seguito ad esercizio fisico ad esaurimento solo per quanto riguarda la GR. I nostri dati non mostrano una significativa variazione dell'attività né della GR né della GST nei ratti sottoposti al solo esercizio fisico rispetto ai controlli, questo dato è in accordo con studi recentemente pubblicati (*Antunes-Neto et al. 2006; Gul et al., 2002*). Antunes-Neto et al. hanno valutato, a livello eritrocitario, la risposta dei principali enzimi antiossidanti allo stress indotto da esercizio fisico ad esaurimento, dimostrando che l'attività della GR risulta indotta solo a 3 ore dopo il termine dell'attività fisica, mentre a tempi più brevi l'attività rimane del tutto paragonabile a quella dei controlli. Precedentemente *Gul et al. (2002)* avevano descritto che l'attività della GST non viene influenzata dall'esercizio fisico. Come descritto nel capitolo *Materiali e metodi* il protocollo di esercizio fisico prevedeva che i ratti fossero sacrificati subito dopo il termine dell'esercizio fisico, ciò ha quindi impedito di evidenziare eventuali variazioni indotte dal solo esercizio fisico. Nel caso della GPx, enzima Selenio dipendente, nessuna delle condizioni sperimentali ha modificato l'attività dell'enzima rispetto ai controlli. In una recente pubblicazione *Campbell et al. (2007)* hanno messo a confronto la capacità di SF e del Selenio di indurre gli enzimi coinvolti nei cicli redox del GSH e della Trx in una linea di cellule endoteliali. In accordo con quanto risulta anche dal nostro studio, essi non hanno notato alcun effetto del trattamento con SF sull'espressione della GPx che risultava invece indotta dal trattamento con Selenio. Analizzando gli effetti del trattamento con SF sugli enzimi coinvolti nell'omeostasi del GSH possiamo concludere che SF sembra contribuire a mantenere elevato il potere riducente del tessuto muscolare stimolando l'attività della GR, una flavoproteina che permette di ridurre GSSG a GSH attraverso l'ossidazione del NADPH a NADP⁺, reazione essenziale per la disponibilità di GSH in vivo.

La Trx è una piccola proteina caratterizzata da un tiolo reattivo e svolge importanti funzioni come regolatore redox (*Holmgren, 1989*). La forma ridotta della Trx contiene un gruppo disolfuro con capacità ossidoriduttive marcate, che agisce riducendo i disolfuri e ossidando le cisteine presenti nelle proteine. A sua volta la Trx ossidata viene ridotta da TR utilizzando NADPH come cofattore. Trx funziona come scavenger per le ROS a livello cellulare, regola le interazioni proteine-acidi nucleici, può rappresentare un messaggero per l'induzione di numerosi segnali di

trasduzione, modula alcune vie di trasduzione del segnale e alcune attività enzimatiche (*Shioji et al., 2003; Yamawaki et al., 2003*). Un solo studio ha finora indagato gli effetti dell'esercizio acuto ad esaurimento sui livelli di attività della TR nei ratti (*Hatao et al., 2006*). Sebbene gli Autori abbiano valutato l'attività della TR a livello di omogenati polmonari, i loro dati concordano con i risultati ottenuti nella ricerca oggetto di questa tesi e indicano che l'esercizio fisico non determina variazioni significative dell'attività di questo enzima. Il trattamento con SF, alle concentrazioni utilizzate, non ha indotto variazioni dell'attività della TR.

In questo studio si è osservato anche un incremento di attività di NQO1 nel tessuto muscolare in seguito al trattamento con SF. La NQO1, oltre ad essere in grado di attivare e disattivare composti esogeni, ha un ruolo nel metabolismo di chinoni endogeni quali l'ubichinone e la vitamina E. In questo contesto NQO1 agisce come enzima antiossidante, grazie alla sua capacità di mantenere i livelli cellulari di ubichinolo e di rigenerare l'idrochinone della vitamina E, due potenti composti antiossidanti non proteici (*Ross et al., 2000*). Molti studi hanno precedentemente riportato che SF stimola l'attività e l'espressione di NQO1 in numerosi tessuti e modelli cellulari. I dati da noi ottenuti mostrano anche che questa stimolazione si mantiene, almeno in parte, al termine di un esercizio fisico acuto ad esaurimento, e che il trattamento con SF preserva l'attività di NQO1 dal decremento che si nota in seguito a questo tipo di stress nei ratti non trattati.

SOD e CAT sono due importanti enzimi antiossidanti che agiscono sinergicamente catalizzando la completa riduzione del radicale $O_2^{\cdot-}$ ad acqua e ossigeno passando per l'intermedio H_2O_2 . Sulla base di evidenze scientifiche ormai note da molti anni, il ruolo della reazione di dismutazione catalizzata dalla SOD riveste grande importanza nel mantenimento dell'equilibrio redox dell'organismo, soprattutto quando, come nel caso di esercizio fisico ad esaurimento o nel caso di fenomeni di ipossia e riossigenazione, il responsabile della formazione delle ROS è principalmente l'enzima XO (*Pattwell et al., 2004; Li et al., 2002; Hellsten et al., 1988*). La XO è un enzima coinvolto nel catabolismo delle basi azotate, esso determina la conversione della xantina ad acido urico generando $O_2^{\cdot-}$ come prodotto secondario. L'intensa produzione di $O_2^{\cdot-}$, causata dall'attivazione della XO durante l'esercizio fisico ad esaurimento, suggerisce l'importanza dell'azione di SOD e CAT nel proteggere l'organismo dallo stress ossidativo. I dati ottenuti in questo studio indicano che l'esercizio ad esaurimento induce una significativa riduzione dell'attività della SOD, e che il trattamento con SF non influenza l'attività di questo enzima antiossidante a livello muscolare; al contrario, nessuna

delle condizioni sperimentali esaminate ha modificato l'attività della CAT. Sebbene in letteratura non siano presenti studi che abbiano analizzato gli effetti del trattamento con SF sull'induzione di SOD e CAT a livello muscolare, è stato recentemente notato che in alcuni modelli di cellule epatiche e fibroblasti cardiaci anche SOD e CAT possono essere indotte attraverso una via Nrf2 mediata in seguito al trattamento con xenobiotici (*Zhu et al., 2005; Kwak et al., 2003*). La discrepanza tra i dati ottenuti nel nostro studio e quelli presenti in letteratura richiede quindi ulteriori studi ed approfondimenti; gli aspetti che probabilmente hanno contribuito a non evidenziare variazioni significative a livello di questi due enzimi antiossidanti sono da ricercare soprattutto nel diverso tipo di trattamento, nella durata dello stesso e nella maggior complessità del modello animale utilizzato rispetto a sistemi cellulari in vitro.

Gomez-Cabrera et al. (2007) hanno recentemente ribadito che le ROS sono una delle principali cause di lesioni e danni muscolari durante l'esercizio ad esaurimento; la capacità di SF di innalzare chiaramente l'attività della GR e della NQO1 può contribuire a spiegare il complessivo effetto protettivo di SF, suggerito dalla riduzione del rilascio di LDH nel plasma in seguito ad esercizio fisico ad esaurimento. Gli effetti protettivi dell'esercizio moderato sui livelli di stress ossidativo hanno permesso ad alcuni Autori di definire l'esercizio moderato come un vero e proprio antiossidante. Basandosi sul concetto di ormesi, questi Autori hanno anche dimostrato che l'utilizzo di molecole capaci di inibire gli enzimi responsabili della formazione delle ROS o l'utilizzo di molecole antiossidanti capaci di agire da scavenger diretti delle ROS, prevengono l'induzione degli enzimi antiossidanti e detossificanti modulata dall'esercizio fisico moderato (*Gomez-Cabrera et al., 2007*). I dati da noi ottenuti, anche se su un modello di esercizio ad esaurimento, si inseriscono in questo contesto suggerendo che il SF, agendo da antiossidante indiretto e quindi inducendo l'espressione di alcuni enzimi coinvolti nella detossificazione dalle ROS, senza operare di per se un'azione di scavenger, possa esercitare un effetto sinergico con l'esercizio moderato nella protezione dell'organismo dallo stress ossidativo. Questa ipotesi potrà essere il punto di partenza per ricerche future tese a determinare se l'assunzione dietetica di SF possa agire in maniera sinergica con l'esercizio fisico moderato per stimolare le difese antiossidanti endogene dell'organismo.

8.3 Conclusioni

I dati descritti in questa tesi mostrano che SF è un potente induttore dei meccanismi cellulari di difesa, sia per quanto riguarda le capacità detossificanti cellulari sia per quanto riguarda le capacità della cellula di contrastare lo stress ossidativo. I nostri risultati permettono di raggiungere questa conclusione in entrambi i modelli sperimentali considerati.

A livello cardiaco SF si propone come nutraceutico d'elezione nella prevenzione della cardiotoxicità da danno ossidativo, evento che è spesso posto in relazione alla mortalità che si verifica dopo l'evento ischemico stesso. Inoltre la nostra ricerca ha, per la prima volta, valutato la possibilità che SF possa contribuire a prevenire lo stress ossidativo indotto dall'esercizio fisico ad esaurimento nel tessuto muscolare scheletrico.

Il nostro studio si propone come studio pilota nell'investigazione della relazione tra esercizio fisico e composti nutraceutici. SF, infatti, agendo come antiossidante indiretto, e quindi capace di modulare i meccanismi di difesa cellulare anche a livello muscolare, risulta essere un promettente composto fitochimico capace di agire in modo sinergico con gli adattamenti positivi indotti da un esercizio fisico moderato.

Le nostre ricerche future saranno rivolte ad indagare questi aspetti, per determinare se anche l'assunzione di questo nutraceutico come componente della dieta oltre che come composto puro possa conferire protezione ai tessuti muscolari.

Bibliografia

- Adam-Vizi, V., & Chinopoulos, C. (2006). Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends Pharmacol Sci*, 27(12), 639-645.
- Ago, T., Yeh, I., Yamamoto, M., Schinke-Braun, M., Brown, J. A., Tian, B., et al. (2006). Thioredoxin1 upregulates mitochondrial proteins related to oxidative phosphorylation and TCA cycle in the heart. *Antioxid Redox Signal*, 8(9-10), 1635-1650.
- Al Janobi, A. A., Mithen, R. F., Gasper, A. V., Shaw, P. N., Middleton, R. J., Ortori, C. A., et al. (2006). Quantitative measurement of sulforaphane, iberin and their mercapturic acid pathway metabolites in human plasma and urine using liquid chromatography-tandem electrospray ionisation mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 844(2), 223-234.
- Alam, J., Stewart, D., Touchard, C., Boinapally, S., Choi, A. M., & Cook, J. L. (1999). Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene. *J Biol Chem*, 274(37), 26071-26078.
- Alessio, H. M., & Goldfarb, A. H. (1988). Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptive response to training. *J Appl Physiol*, 64(4), 1333-1336.
- Ali, M. A., Yasui, F., Matsugo, S., & Konishi, T. (2000). The lactate-dependent enhancement of hydroxyl radical generation by the Fenton reaction. *Free Radic Res*, 32(5), 429-438.
- Almar, M., Villa, J. G., Cuevas, M. J., Rodriguez-Marroyo, J. A., Avila, C., & Gonzalez-Gallego, J. (2002). Urinary levels of 8-hydroxydeoxyguanosine as a marker of oxidative damage in road cycling. *Free Radic Res*, 36(3), 247-253.
- Alonso, M., Collado, P. S., & Gonzalez-Gallego, J. (2006). Melatonin inhibits the expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase and nuclear factor kappa B activation in rat skeletal muscle. *J Pineal Res*, 41(1), 8-14.
- Ambrosone, C. B., McCann, S. E., Freudenheim, J. L., Marshall, J. R., Zhang, Y., & Shields, P. G. (2004). Breast cancer risk in premenopausal women is inversely associated with consumption of broccoli, a source of isothiocyanates, but is not modified by GST genotype. *J Nutr*, 134(5), 1134-1138.
- Ames, B. N. (1983). Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science*, 221(4617), 1256-1264.
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K., & Hagen, T. M. (1995). Mitochondrial decay in aging. *Biochim Biophys Acta*, 1271(1), 165-170.
- Antunes-Neto, J. M., Toyama, M. H., Carneiro, E. M., Boschero, A. C., Pereira-da-Silva, L., & Macedo, D. V. (2006). Circulating leukocyte heat shock protein 70 (HSP70) and oxidative stress markers in rats after a bout of exhaustive exercise. *Stress*, 9(2), 107-115.
- Argyrou, A., & Blanchard, J. S. (2004). Flavoprotein disulfide reductases: advances in chemistry and function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 78, 89-142.
- Ashton, T., Rowlands, C. C., Jones, E., Young, I. S., Jackson, S. K., Davies, B., et al. (1998). Electron spin resonance spectroscopic detection of oxygen-centred radicals in human serum following exhaustive exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 77(6), 498-502.
- Aslund, F., & Beckwith, J. (1999). Bridge over troubled waters: sensing stress by disulfide bond formation. *Cell*, 96(6), 751-753.
- Bao, Y., Jemth, P., Mannervik, B., & Williamson, G. (1997). Reduction of thymine hydroperoxide by phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and glutathione transferases. *FEBS Lett*, 410(2-3), 210-212.
- Baran, C. P., Zeigler, M. M., Tridandapani, S., & Marsh, C. B. (2004). The role of ROS and RNS in regulating life and death of blood monocytes. *Curr Pharm Des*, 10(8), 855-866.
- Barcelo, S., Gardiner, J. M., Gescher, A., & Chipman, J. K. (1996). CYP2E1-mediated mechanism of anti-genotoxicity of the broccoli constituent sulforaphane. *Carcinogenesis*, 17(2), 277-282.
- Barcelo, S., Mace, K., Pfeifer, A. M., & Chipman, J. K. (1998). Production of DNA strand breaks by N-nitrosodimethylamine and 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in THLE cells expressing human CYP isoenzymes and inhibition by sulforaphane. *Mutat Res*, 402(1-2), 111-120.
- Basten, G. P., Bao, Y., & Williamson, G. (2002). Sulforaphane and its glutathione conjugate but not sulforaphane nitrile induce UDP-glucuronosyl transferase (UGT1A1) and glutathione transferase (GSTA1) in cultured cells. *Carcinogenesis*, 23(8), 1399-1404.

-
- Beall, H. D., Liu, Y., Siegel, D., Bolton, E. M., Gibson, N. W., & Ross, D. (1996). Role of NAD(P)H:quinone oxidoreductase (DT-diaphorase) in cytotoxicity and induction of DNA damage by streptonigrin. *Biochem Pharmacol*, *51*(5), 645-652.
- Bejma, J., Ramires, P., & Ji, L. L. (2000). Free radical generation and oxidative stress with ageing and exercise: differential effects in the myocardium and liver. *Acta Physiol Scand*, *169*(4), 343-351.
- Berliner, J. A., & Heinecke, J. W. (1996). The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic Biol Med*, *20*(5), 707-727.
- Bertini, R., Howard, O. M., Dong, H. F., Oppenheim, J. J., Bizzarri, C., Sergi, R., et al. (1999). Thioredoxin, a redox enzyme released in infection and inflammation, is a unique chemoattractant for neutrophils, monocytes, and T cells. *J Exp Med*, *189*(11), 1783-1789.
- Bogaards, J. J., Verhagen, H., Willems, M. I., van Poppel, G., & van Bladeren, P. J. (1994). Consumption of Brussels sprouts results in elevated alpha-class glutathione S-transferase levels in human blood plasma. *Carcinogenesis*, *15*(5), 1073-1075.
- Bones, A. M., & Rossiter, J. T. (2006). The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates. *Phytochemistry*, *67*(11), 1053-1067.
- Bonnesen, C., Eggleston, I. M., & Hayes, J. D. (2001). Dietary indoles and isothiocyanates that are generated from cruciferous vegetables can both stimulate apoptosis and confer protection against DNA damage in human colon cell lines. *Cancer Res*, *61*(16), 6120-6130.
- Booth, F. W., & Lees, S. J. (2007). Fundamental questions about genes, inactivity, and chronic diseases. *Physiol Genomics*, *28*(2), 146-157.
- Bordoni, A., Biagi, P. L., Angeloni, C., Leoncini, E., Muccinelli, I., & Hrelia, S. (2003). Selenium supplementation can protect cultured rat cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation damage. *J Agric Food Chem*, *51*(6), 1736-1740.
- Brantley, R. E., Jr., Smerdon, S. J., Wilkinson, A. J., Singleton, E. W., & Olson, J. S. (1993). The mechanism of autooxidation of myoglobin. *J Biol Chem*, *268*(10), 6995-7010.
- Brennan, P., Hsu, C. C., Moullan, N., Szeszenia-Dabrowska, N., Lissowska, J., Zaridze, D., et al. (2005). Effect of cruciferous vegetables on lung cancer in patients stratified by genetic status: a mendelian randomisation approach. *Lancet*, *366*(9496), 1558-1560.
- Broker, L. E., Kruyt, F. A., & Giaccone, G. (2005). Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res*, *11*(9), 3155-3162.
- Brooks, J. D., Paton, V. G., & Vidanes, G. (2001). Potent induction of phase 2 enzymes in human prostate cells by sulforaphane. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, *10*(9), 949-954.
- Brusewitz, G., Cameron, B. D., Chasseaud, L. F., Gorler, K., Hawkins, D. R., Koch, H., et al. (1977). The metabolism of benzyl isothiocyanate and its cysteine conjugate. *Biochem J*, *162*(1), 99-107.
- Burmeister, W. P., Cottaz, S., Rollin, P., Vasella, A., & Henrissat, B. (2000). High resolution X-ray crystallography shows that ascorbate is a cofactor for myrosinase and substitutes for the function of the catalytic base. *J Biol Chem*, *275*(50), 39385-39393.
- Callaway, E. C., Zhang, Y., Chew, W., & Chow, H. H. (2004). Cellular accumulation of dietary anticarcinogenic isothiocyanates is followed by transporter-mediated export as dithiocarbamates. *Cancer Lett*, *204*(1), 23-31.
- Campbell, L., Howie, F., Arthur, J. R., Nicol, F., & Beckett, G. (2007). Selenium and sulforaphane modify the expression of selenoenzymes in the human endothelial cell line EAhy926 and protect cells from oxidative damage. *Nutrition*, *23*(2), 138-144.
- Chaudiere, J., & Ferrari-Iliou, R. (1999). Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem Toxicol*, *37*(9-10), 949-962.
- Childs, A., Jacobs, C., Kaminski, T., Halliwell, B., & Leeuwenburgh, C. (2001). Supplementation with vitamin C and N-acetyl-cysteine increases oxidative stress in humans after an acute muscle injury induced by eccentric exercise. *Free Radic Biol Med*, *31*(6), 745-753.
- Choi, S., Lew, K. L., Xiao, H., Herman-Antosiewicz, A., Xiao, D., Brown, C. K., et al. (2007). D,L-Sulforaphane-induced cell death in human prostate cancer cells is regulated by inhibitor of apoptosis family proteins and Apaf-1. *Carcinogenesis*, *28*(1), 151-162.
- Conaway, C. C., Getahun, S. M., Liebes, L. L., Pusateri, D. J., Topham, D. K., Botero-Omary, M., et al. (2000). Disposition of glucosinolates and sulforaphane in humans after ingestion of steamed and fresh broccoli. *Nutr Cancer*, *38*(2), 168-178.
- Conaway, C. C., Jiao, D., Kohri, T., Liebes, L., & Chung, F. L. (1999). Disposition and pharmacokinetics of phenethyl isothiocyanate and 6-phenylhexyl isothiocyanate in F344 rats. *Drug Metab Dispos*, *27*(1), 13-20.
-

-
- Cook, R. R., & Calabrese, E. J. (2006). Hormesis is biology, not religion. *Environ Health Perspect*, 114(12), A688.
- Coombes, J. S., Rowell, B., Dodd, S. L., Demirel, H. A., Naito, H., Shanely, R. A., et al. (2002). Effects of vitamin E deficiency on fatigue and muscle contractile properties. *Eur J Appl Physiol*, 87(3), 272-277.
- Cooper, C. E., Vollaard, N. B., Choueiri, T., & Wilson, M. T. (2002). Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem Soc Trans*, 30(2), 280-285.
- Cuevas, M. J., Almar, M., Garcia-Glez, J. C., Garcia-Lopez, D., De Paz, J. A., Alvear-Ordenes, I., et al. (2005). Changes in oxidative stress markers and NF-kappaB activation induced by sprint exercise. *Free Radic Res*, 39(4), 431-439.
- Dandona, P., Thusu, K., Cook, S., Snyder, B., Makowski, J., Armstrong, D., et al. (1996). Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *Lancet*, 347(8999), 444-445.
- Davies, K. J., Quintanilha, A. T., Brooks, G. A., & Packer, L. (1982). Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun*, 107(4), 1198-1205.
- Degterev, A., Boyce, M., & Yuan, J. (2003). A decade of caspases. *Oncogene*, 22(53), 8543-8567.
- Delhalle, S., Blasius, R., Dicato, M., & Diederich, M. (2004). A beginner's guide to NF-kappaB signaling pathways. *Ann N Y Acad Sci*, 1030, 1-13.
- Devling, T. W., Lindsay, C. D., McLellan, L. I., McMahon, M., & Hayes, J. D. (2005). Utility of siRNA against Keap1 as a strategy to stimulate a cancer chemopreventive phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(20), 7280-7285A.
- Di Monte, D., Ross, D., Bellomo, G., Eklow, L., & Orrenius, S. (1984). Alterations in intracellular thiol homeostasis during the metabolism of menadione by isolated rat hepatocytes. *Arch Biochem Biophys*, 235(2), 334-342.
- Di Napoli, M., Shah, I. M., & Stewart, D. A. (2007). Molecular pathways and genetic aspects of Parkinson's disease: from bench to bedside. *Expert Rev Neurother*, 7(12), 1693-1729.
- Dinkova-Kostova, A. T. (2002). Protection against cancer by plant phenylpropanoids: induction of mammalian anticarcinogenic enzymes. *Mini Rev Med Chem*, 2(6), 595-610.
- Dinkova-Kostova, A. T., & Talalay, P. (2000). Persuasive evidence that quinone reductase type 1 (DT diaphorase) protects cells against the toxicity of electrophiles and reactive forms of oxygen. *Free Radic Biol Med*, 29(3-4), 231-240.
- Domigan, N. M., Charlton, T. S., Duncan, M. W., Winterbourn, C. C., & Kettle, A. J. (1995). Chlorination of tyrosyl residues in peptides by myeloperoxidase and human neutrophils. *J Biol Chem*, 270(28), 16542-16548.
- Draper, H. H., & Hadley, M. (1990). A review of recent studies on the metabolism of exogenous and endogenous malondialdehyde. *Xenobiotica*, 20(9), 901-907.
- Edlund, C., Elhammer, A., & Dallner, G. (1982). Distribution of newly synthesized DT-diaphorase in rat liver. *Biosci Rep*, 2(11), 861-865.
- Egglar, A. L., Liu, G., Pezzuto, J. M., van Breemen, R. B., & Mesecar, A. D. (2005). Modifying specific cysteines of the electrophile-sensing human Keap1 protein is insufficient to disrupt binding to the Nrf2 domain Neh2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(29), 10070-10075.
- Eliasson, M., Bostrom, M., & DePierre, J. W. (1999). Levels and subcellular distributions of detoxifying enzymes in the ovarian corpus luteum of the pregnant and non-pregnant pig. *Biochem Pharmacol*, 58(8), 1287-1292.
- Fahey, J. W., Haristoy, X., Dolan, P. M., Kensler, T. W., Scholtus, I., Stephenson, K. K., et al. (2002). Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a]pyrene-induced stomach tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(11), 7610-7615.
- Fahey, J. W., & Talalay, P. (1999). Antioxidant functions of sulforaphane: a potent inducer of Phase II detoxication enzymes. *Food Chem Toxicol*, 37(9-10), 973-979.
- Fahey, J. W., Zalcmann, A. T., & Talalay, P. (2001). The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, 56(1), 5-51.
- Fahey, J. W., Zhang, Y., & Talalay, P. (1997). Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(19), 10367-10372.
- Favreau, L. V., & Pickett, C. B. (1991). Transcriptional regulation of the rat NAD(P)H:quinone reductase gene. Identification of regulatory elements controlling basal level expression and inducible expression by planar aromatic compounds and phenolic antioxidants. *J Biol Chem*, 266(7), 4556-4561.
-

-
- Favreau, L. V., & Pickett, C. B. (1995). The rat quinone reductase antioxidant response element. Identification of the nucleotide sequence required for basal and inducible activity and detection of antioxidant response element-binding proteins in hepatoma and non-hepatoma cell lines. *J Biol Chem*, 270(41), 24468-24474.
- Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809), 239-247.
- Floyd, R. A. (1990). The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 11(9), 1447-1450.
- Fraga, C. G., Shigenaga, M. K., Park, J. W., Degan, P., & Ames, B. N. (1990). Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(12), 4533-4537.
- Fridovich, I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem*, 64, 97-112.
- Frieling, R. S., Bensimon, A., Tichauer, Y., & Daniel, V. (1990). Xenobiotic-inducible expression of murine glutathione S-transferase Ya subunit gene is controlled by an electrophile-responsive element. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(16), 6258-6262.
- Fujii, N., Boppart, M. D., Dufresne, S. D., Crowley, P. F., Jozsi, A. C., Sakamoto, K., et al. (2004). Overexpression or ablation of JNK in skeletal muscle has no effect on glycogen synthase activity. *Am J Physiol Cell Physiol*, 287(1), C200-208.
- Fusco, D., Colloca, G., Lo Monaco, M. R., & Cesari, M. (2007). Effects of antioxidant supplementation on the aging process. *Clin Interv Aging*, 2(3), 377-387.
- Gamet-Payraastre, L., Lumeau, S., Gasc, N., Cassar, G., Rollin, P., & Tulliez, J. (1998). Selective cytostatic and cytotoxic effects of glucosinolates hydrolysis products on human colon cancer cells in vitro. *Anticancer Drugs*, 9(2), 141-148.
- Gasdaska, J. R., Berggren, M., & Powis, G. (1995). Cell growth stimulation by the redox protein thioredoxin occurs by a novel helper mechanism. *Cell Growth Differ*, 6(12), 1643-1650.
- Gate, L., Paul, J., Ba, G. N., Tew, K. D., & Tapiero, H. (1999). Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomed Pharmacother*, 53(4), 169-180.
- Gerhauser, C., You, M., Liu, J., Moriarty, R. M., Hawthorne, M., Mehta, R. G., et al. (1997). Cancer chemopreventive potential of sulforamate, a novel analogue of sulforaphane that induces phase 2 drug-metabolizing enzymes. *Cancer Res*, 57(2), 272-278.
- Gilmore, T. D. (2006). Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*, 25(51), 6680-6684.
- Gingras, D., Gendron, M., Boivin, D., Moghrabi, A., Theoret, Y., & Beliveau, R. (2004). Induction of medulloblastoma cell apoptosis by sulforaphane, a dietary anticarcinogen from Brassica vegetables. *Cancer Lett*, 203(1), 35-43.
- Goldfarb, A. H. (1999). Nutritional antioxidants as therapeutic and preventive modalities in exercise-induced muscle damage. *Can J Appl Physiol*, 24(3), 249-266.
- Gomez-Cabrera, M. C., Domenech, E., & Vina, J. (2008). Moderate exercise is an antioxidant: Upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radic Biol Med*, 44(2), 126-131.
- Gomez-Cabrera, M. C., Martinez, A., Santangelo, G., Pallardo, F. V., Sastre, J., & Vina, J. (2006). Oxidative stress in marathon runners: interest of antioxidant supplementation. *Br J Nutr*, 96 Suppl 1, S31-33.
- Goodyear, L. J., & Kahn, B. B. (1998). Exercise, glucose transport, and insulin sensitivity. *Annu Rev Med*, 49, 235-261.
- Gorler, K., Krumbiegel, G., Mennicke, W. H., & Siehl, H. U. (1982). The metabolism of benzyl isothiocyanate and its cysteine conjugate in guinea-pigs and rabbits. *Xenobiotica*, 12(9), 535-542.
- Griendling, K. K., & FitzGerald, G. A. (2003a). Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation*, 108(16), 1912-1916.
- Griendling, K. K., & FitzGerald, G. A. (2003b). Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: animal and human studies. *Circulation*, 108(17), 2034-2040.
- Gross-Steinmeyer, K., Stapleton, P. L., Liu, F., Tracy, J. H., Bammler, T. K., Quigley, S. D., et al. (2004). Phytochemical-induced changes in gene expression of carcinogen-metabolizing enzymes in cultured human primary hepatocytes. *Xenobiotica*, 34(7), 619-632.
- Groussard, C., Rannou-Bekono, F., Machefer, G., Chevanne, M., Vincent, S., Sergent, O., et al. (2003). Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise. *Eur J Appl Physiol*, 89(1), 14-20.
-

-
- Gul, M., Demircan, B., Taysi, S., Oztasan, N., Gumustekin, K., Siktar, E., et al. (2006). Effects of endurance training and acute exhaustive exercise on antioxidant defense mechanisms in rat heart. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 143(2), 239-245.
- Gul, M., Laaksonen, D. E., Atalay, M., Vider, L., & Hanninen, O. (2002). Effects of endurance training on tissue glutathione homeostasis and lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Scand J Med Sci Sports*, 12(3), 163-170.
- Hankinson, O. (1995). The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 35, 307-340.
- Harris, E. D. (1992). Regulation of antioxidant enzymes. *Faseb J*, 6(9), 2675-2683.
- Hatao, H., Oh-ishi, S., Itoh, M., Leeuwenburgh, C., Ohno, H., Ookawara, T., et al. (2006). Effects of acute exercise on lung antioxidant enzymes in young and old rats. *Mech Ageing Dev*, 127(4), 384-390.
- Hayes, J. D., Ellis, E. M., Neal, G. E., Harrison, D. J., & Manson, M. M. (1999). Cellular response to cancer chemopreventive agents: contribution of the antioxidant responsive element to the adaptive response to oxidative and chemical stress. *Biochem Soc Symp*, 64, 141-168.
- Hayes, J. D., Flanagan, J. U., & Jowsey, I. R. (2005). Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 45, 51-88.
- Hayes, J. D., & Pulford, D. J. (1995). The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 30(6), 445-600.
- Hellsten, Y., Ahlborg, G., Jensen-Urstad, M., & Sjodin, B. (1988). Indication of in vivo xanthine oxidase activity in human skeletal muscle during exercise. *Acta Physiol Scand*, 134(1), 159-160.
- Heunks, L. M., Vina, J., van Herwaarden, C. L., Folgering, H. T., Gimeno, A., & Dekhuijzen, P. N. (1999). Xanthine oxidase is involved in exercise-induced oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol*, 277(6 Pt 2), R1697-1704.
- Hintze, K. J., Keck, A. S., Finley, J. W., & Jeffery, E. H. (2003). Induction of hepatic thioredoxin reductase activity by sulforaphane, both in Hepal1c7 cells and in male Fisher 344 rats. *J Nutr Biochem*, 14(3), 173-179.
- Hintze, K. J., Wald, K. A., Zeng, H., Jeffery, E. H., & Finley, J. W. (2003). Thioredoxin reductase in human hepatoma cells is transcriptionally regulated by sulforaphane and other electrophiles via an antioxidant response element. *J Nutr*, 133(9), 2721-2727.
- Ho, R. C., Hirshman, M. F., Li, Y., Cai, D., Farmer, J. R., Aschenbach, W. G., et al. (2005). Regulation of I κ B kinase and NF- κ B in contracting adult rat skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 289(4), C794-801.
- Hollander, J., Fiebig, R., Gore, M., Bejma, J., Ookawara, T., Ohno, H., et al. (1999). Superoxide dismutase gene expression in skeletal muscle: fiber-specific adaptation to endurance training. *Am J Physiol*, 277(3 Pt 2), R856-862.
- Hollander, J., Fiebig, R., Gore, M., Ookawara, T., Ohno, H., & Ji, L. L. (2001). Superoxide dismutase gene expression is activated by a single bout of exercise in rat skeletal muscle. *Pflugers Arch*, 442(3), 426-434.
- Holmgren, A. (1985). Thioredoxin. *Annu Rev Biochem*, 54, 237-271.
- Hong, F., Freeman, M. L., & Liebler, D. C. (2005). Identification of sensor cysteines in human Keap1 modified by the cancer chemopreventive agent sulforaphane. *Chem Res Toxicol*, 18(12), 1917-1926.
- Hu, R., Xu, C., Shen, G., Jain, M. R., Khor, T. O., Gopalkrishnan, A., et al. (2006). Gene expression profiles induced by cancer chemopreventive isothiocyanate sulforaphane in the liver of C57BL/6J mice and C57BL/6J/Nrf2 (-/-) mice. *Cancer Lett*, 243(2), 170-192.
- Hu, Y., Urig, S., Koncarevic, S., Wu, X., Fischer, M., Rahlfs, S., et al. (2007). Glutathione- and thioredoxin-related enzymes are modulated by sulfur-containing chemopreventive agents. *Biol Chem*, 388(10), 1069-1081.
- Huang, H., Starodub, O., McIntosh, A., Kier, A. B., & Schroeder, F. (2002). Liver fatty acid-binding protein targets fatty acids to the nucleus. Real time confocal and multiphoton fluorescence imaging in living cells. *J Biol Chem*, 277(32), 29139-29151.
- Igarashi, K., Kataoka, K., Itoh, K., Hayashi, N., Nishizawa, M., & Yamamoto, M. (1994). Regulation of transcription by dimerization of erythroid factor NF-E2 p45 with small Maf proteins. *Nature*, 367(6463), 568-572.
-

-
- Ignarro, L. J. (1990). Haem-dependent activation of guanylate cyclase and cyclic GMP formation by endogenous nitric oxide: a unique transduction mechanism for transcellular signaling. *Pharmacol Toxicol*, 67(1), 1-7.
- Ikeda, S., Kawamoto, H., Kasaoka, K., Hitomi, Y., Kizaki, T., Sankai, Y., et al. (2006). Muscle type-specific response of PGC-1 alpha and oxidative enzymes during voluntary wheel running in mouse skeletal muscle. *Acta Physiol (Oxf)*, 188(3-4), 217-223.
- Inal, M., Akyuz, F., Turgut, A., & Getsfrid, W. M. (2001). Effect of aerobic and anaerobic metabolism on free radical generation swimmers. *Med Sci Sports Exerc*, 33(4), 564-567.
- Ishii, N. (2007). Role of oxidative stress from mitochondria on aging and cancer. *Cornea*, 26(9 Suppl 1), S3-9.
- Ishii, T., Itoh, K., Takahashi, S., Sato, H., Yanagawa, T., Katoh, Y., et al. (2000). Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. *J Biol Chem*, 275(21), 16023-16029.
- Jackman, R. W., & Kandarian, S. C. (2004). The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*, 287(4), C834-843.
- Jackson, S. J., & Singletary, K. W. (2004). Sulforaphane inhibits human MCF-7 mammary cancer cell mitotic progression and tubulin polymerization. *J Nutr*, 134(9), 2229-2236.
- Jaiswal, A. K. (1991). Human NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) gene structure and induction by dioxin. *Biochemistry*, 30(44), 10647-10653.
- Jakubikova, J., Sedlak, J., Bod'o, J., & Bao, Y. (2006). Effect of isothiocyanates on nuclear accumulation of NF-kappaB, Nrf2, and thioredoxin in caco-2 cells. *J Agric Food Chem*, 54(5), 1656-1662.
- Jakubikova, J., Sedlak, J., Mithen, R., & Bao, Y. (2005). Role of PI3K/Akt and MEK/ERK signaling pathways in sulforaphane- and erucin-induced phase II enzymes and MRP2 transcription, G2/M arrest and cell death in Caco-2 cells. *Biochem Pharmacol*, 69(11), 1543-1552.
- Jamurtas, A. Z., Theocharis, V., Tofas, T., Tsiokanos, A., Yfanti, C., Paschalis, V., et al. (2005). Comparison between leg and arm eccentric exercises of the same relative intensity on indices of muscle damage. *Eur J Appl Physiol*, 95(2-3), 179-185.
- Jeong, W. S., Jun, M., & Kong, A. N. (2006). Nrf2: a potential molecular target for cancer chemoprevention by natural compounds. *Antioxid Redox Signal*, 8(1-2), 99-106.
- Jeong, W. S., Keum, Y. S., Chen, C., Jain, M. R., Shen, G., Kim, J. H., et al. (2005). Differential expression and stability of endogenous nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) by natural chemopreventive compounds in HepG2 human hepatoma cells. *J Biochem Mol Biol*, 38(2), 167-176.
- Ji, L. L. (1995). Exercise and oxidative stress: role of the cellular antioxidant systems. *Exerc Sport Sci Rev*, 23, 135-166.
- Ji, L. L. (1999). Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc Soc Exp Biol Med*, 222(3), 283-292.
- Ji, L. L. (2001). Exercise at old age: does it increase or alleviate oxidative stress? *Ann N Y Acad Sci*, 928, 236-247.
- Ji, L. L. (2002). Exercise-induced modulation of antioxidant defense. *Ann N Y Acad Sci*, 959, 82-92.
- Ji, L. L., Gomez-Cabrera, M. C., Steinhafel, N., & Vina, J. (2004). Acute exercise activates nuclear factor (NF)-kappaB signaling pathway in rat skeletal muscle. *Faseb J*, 18(13), 1499-1506.
- Ji, L. L., Gomez-Cabrera, M. C., & Vina, J. (2006). Exercise and hormesis: activation of cellular antioxidant signaling pathway. *Ann N Y Acad Sci*, 1067, 425-435.
- Jiang, Z. Q., Chen, C., Yang, B., Hebbbar, V., & Kong, A. N. (2003). Differential responses from seven mammalian cell lines to the treatments of detoxifying enzyme inducers. *Life Sci*, 72(20), 2243-2253.
- Johnsen, O., Murphy, P., Prydz, H., & Kolsto, A. B. (1998). Interaction of the CNC-bZIP factor TCF11/LCR-F1/Nrf1 with MafG: binding-site selection and regulation of transcription. *Nucleic Acids Res*, 26(2), 512-520.
- Johnson, F., & Giulivi, C. (2005). Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Mol Aspects Med*, 26(4-5), 340-352.
- Joseph, M. A., Moysich, K. B., Freudenheim, J. L., Shields, P. G., Bowman, E. D., Zhang, Y., et al. (2004). Cruciferous vegetables, genetic polymorphisms in glutathione S-transferases M1 and T1, and prostate cancer risk. *Nutr Cancer*, 50(2), 206-213.
- Kang, M. I., Kobayashi, A., Wakabayashi, N., Kim, S. G., & Yamamoto, M. (2004). Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(7), 2046-2051.
- Kang, Y. J. (2003). New understanding in cardiotoxicity. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 6(1), 110-116.
-

-
- Kataoka, K., Igarashi, K., Itoh, K., Fujiwara, K. T., Noda, M., Yamamoto, M., et al. (1995). Small Maf proteins heterodimerize with Fos and may act as competitive repressors of the NF-E2 transcription factor. *Mol Cell Biol*, 15(4), 2180-2190.
- Kayatekin, B. M., Gonenc, S., Acikgoz, O., Uysal, N., & Dayi, A. (2002). Effects of sprint exercise on oxidative stress in skeletal muscle and liver. *Eur J Appl Physiol*, 87(2), 141-144.
- Keck, A. S., & Finley, J. W. (2006). Aqueous extracts of selenium-fertilized broccoli increase selenoprotein activity and inhibit DNA single-strand breaks, but decrease the activity of quinone reductase in Hepa 1c1c7 cells. *Food Chem Toxicol*, 44(5), 695-703.
- Keck, A. S., Staack, R., & Jeffery, E. H. (2002). The cruciferous nitrile crambene has bioactivity similar to sulforaphane when administered to Fischer 344 rats but is far less potent in cell culture. *Nutr Cancer*, 42(2), 233-240.
- Kefaloyianni, E., Gaitanaki, C., & Beis, I. (2006). ERK1/2 and p38-MAPK signalling pathways, through MSK1, are involved in NF-kappaB transactivation during oxidative stress in skeletal myoblasts. *Cell Signal*, 18(12), 2238-2251.
- Kelloff, G. J., Sigman, C. C., Johnson, K. M., Boone, C. W., Greenwald, P., Crowell, J. A., et al. (2000). Perspectives on surrogate end points in the development of drugs that reduce the risk of cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 9(2), 127-137.
- Kerppola, T. K., & Curran, T. (1994). A conserved region adjacent to the basic domain is required for recognition of an extended DNA binding site by Maf/Nrl family proteins. *Oncogene*, 9(11), 3149-3158.
- Keum, Y. S., Jeong, W. S., & Kong, A. N. (2004). Chemoprevention by isothiocyanates and their underlying molecular signaling mechanisms. *Mutat Res*, 555(1-2), 191-202.
- Keum, Y. S., Yu, S., Chang, P. P., Yuan, X., Kim, J. H., Xu, C., et al. (2006). Mechanism of action of sulforaphane: inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms contributing to the induction of antioxidant response element-mediated heme oxygenase-1 in human hepatoma HepG2 cells. *Cancer Res*, 66(17), 8804-8813.
- Khan, A. U., & Kasha, M. (1994). Singlet molecular oxygen in the Haber-Weiss reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(26), 12365-12367.
- Kim, B. R., Hu, R., Keum, Y. S., Hebbar, V., Shen, G., Nair, S. S., et al. (2003). Effects of glutathione on antioxidant response element-mediated gene expression and apoptosis elicited by sulforaphane. *Cancer Res*, 63(21), 7520-7525.
- Kim, H. S., Park, J. S., Hong, S. J., Woo, M. S., Kim, S. Y., & Kim, K. S. (2003). Regulation of the tyrosine hydroxylase gene promoter by histone deacetylase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun*, 312(4), 950-957.
- Kirkman, H. N., Galiano, S., & Gaetani, G. F. (1987). The function of catalase-bound NADPH. *J Biol Chem*, 262(2), 660-666.
- Kong, L., Tanito, M., Huang, Z., Li, F., Zhou, X., Zaharia, A., et al. (2007). Delay of photoreceptor degeneration in tubby mouse by sulforaphane. *J Neurochem*, 101(4), 1041-1052.
- Kramer, H. F., & Goodyear, L. J. (2007). Exercise, MAPK, and NF-kappaB signaling in skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 103(1), 388-395.
- Kris-Etherton, P. M., Lichtenstein, A. H., Howard, B. V., Steinberg, D., & Witztum, J. L. (2004). Antioxidant vitamin supplements and cardiovascular disease. *Circulation*, 110(5), 637-641.
- Krook, A., Widgren, U., Jiang, X. J., Henriksson, J., Wallberg-Henriksson, H., Alessi, D., et al. (2000). Effects of exercise on mitogen- and stress-activated kinase signal transduction in human skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 279(5), R1716-1721.
- Kuster, G. M., Pimentel, D. R., Adachi, T., Ido, Y., Brenner, D. A., Cohen, R. A., et al. (2005). Alpha-adrenergic receptor-stimulated hypertrophy in adult rat ventricular myocytes is mediated via thioredoxin-1-sensitive oxidative modification of thiols on Ras. *Circulation*, 111(9), 1192-1198.
- Kwak, M. K., Egner, P. A., Dolan, P. M., Ramos-Gomez, M., Groopman, J. D., Itoh, K., et al. (2001). Role of phase 2 enzyme induction in chemoprotection by dithiolethiones. *Mutat Res*, 480-481, 305-315.
- Kwak, M. K., Wakabayashi, N., Itoh, K., Motohashi, H., Yamamoto, M., & Kensler, T. W. (2003). Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 pathway. Identification of novel gene clusters for cell survival. *J Biol Chem*, 278(10), 8135-8145.
- Landi, L., Fiorentini, D., Galli, M. C., Segura-Aguilar, J., & Beyer, R. E. (1997). DT-Diaphorase maintains the reduced state of ubiquinones in lipid vesicles thereby promoting their antioxidant function. *Free Radic Biol Med*, 22(1-2), 329-335.
-

-
- Lee, J. M., & Johnson, J. A. (2004). An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. *J Biochem Mol Biol*, 37(2), 139-143.
- Leeuwenburgh, C., Hansen, P. A., Holloszy, J. O., & Heinecke, J. W. (1999). Hydroxyl radical generation during exercise increases mitochondrial protein oxidation and levels of urinary dityrosine. *Free Radic Biol Med*, 27(1-2), 186-192.
- Lefter, D. J., & Granger, D. N. (2000). Oxidative stress and cardiac disease. *Am J Med*, 109(4), 315-323.
- Lewis, S. A., & Levine, R. L. (1995). Determination of 2-oxohistidine by amino acid analysis. *Anal Biochem*, 231(2), 440-446.
- Li, C., & Jackson, R. M. (2002). Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol*, 282(2), C227-241.
- Li, J., Lee, J. M., & Johnson, J. A. (2002). Microarray analysis reveals an antioxidant responsive element-driven gene set involved in conferring protection from an oxidative stress-induced apoptosis in IMR-32 cells. *J Biol Chem*, 277(1), 388-394.
- Li, W., Yu, S. W., & Kong, A. N. (2006). Nrf2 possesses a redox-sensitive nuclear exporting signal in the Neh5 transactivation domain. *J Biol Chem*, 281(37), 27251-27263.
- Li, Y., & Jaiswal, A. K. (1992). Identification of jun-B as third member in human antioxidant response element-nuclear proteins complex. *Biochem Biophys Res Commun*, 188(3), 992-996.
- Lind, C., Hochstein, P., & Ernster, L. (1982). DT-diaphorase as a quinone reductase: a cellular control device against semiquinone and superoxide radical formation. *Arch Biochem Biophys*, 216(1), 178-185.
- Liu, C. C., Huang, C. C., Lin, W. T., Hsieh, C. C., Huang, S. Y., Lin, S. J., et al. (2005). Lycopene supplementation attenuated xanthine oxidase and myeloperoxidase activities in skeletal muscle tissues of rats after exhaustive exercise. *Br J Nutr*, 94(4), 595-601.
- London, S. J., Yuan, J. M., Chung, F. L., Gao, Y. T., Coetzee, G. A., Ross, R. K., et al. (2000). Isothiocyanates, glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms, and lung-cancer risk: a prospective study of men in Shanghai, China. *Lancet*, 356(9231), 724-729.
- Long, D. J., 2nd, Waikel, R. L., Wang, X. J., Perlaky, L., Roop, D. R., & Jaiswal, A. K. (2000). NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 deficiency increases susceptibility to benzo(a)pyrene-induced mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res*, 60(21), 5913-5915.
- Long, D. J., 2nd, Waikel, R. L., Wang, X. J., Roop, D. R., & Jaiswal, A. K. (2001). NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 deficiency and increased susceptibility to 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced carcinogenesis in mouse skin. *J Natl Cancer Inst*, 93(15), 1166-1170.
- Lovlin, R., Cottle, W., Pyke, I., Kavanagh, M., & Belcastro, A. N. (1987). Are indices of free radical damage related to exercise intensity. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 56(3), 313-316.
- Lu, S. C. (1998). Regulation of hepatic glutathione synthesis. *Semin Liver Dis*, 18(4), 331-343.
- Lu, S. C. (2000). Regulation of glutathione synthesis. *Curr Top Cell Regul*, 36, 95-116.
- Lunec, J., Halloran, S. P., White, A. G., & Dormandy, T. L. (1981). Free-radical oxidation (peroxidation) products in serum and synovial fluid in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 8(2), 233-245.
- MacIntyre, D. L., Reid, W. D., Lyster, D. M., & McKenzie, D. C. (2000). Different effects of strenuous eccentric exercise on the accumulation of neutrophils in muscle in women and men. *Eur J Appl Physiol*, 81(1-2), 47-53.
- Maheo, K., Morel, F., Langouet, S., Kramer, H., Le Ferrec, E., Ketterer, B., et al. (1997). Inhibition of cytochromes P-450 and induction of glutathione S-transferases by sulforaphane in primary human and rat hepatocytes. *Cancer Res*, 57(17), 3649-3652.
- Marini, M. G., Chan, K., Casula, L., Kan, Y. W., Cao, A., & Moi, P. (1997). hMAF, a small human transcription factor that heterodimerizes specifically with Nrf1 and Nrf2. *J Biol Chem*, 272(26), 16490-16497.
- Mastaloudis, A., Traber, M. G., Carstensen, K., & Widrick, J. J. (2006). Antioxidants did not prevent muscle damage in response to an ultramarathon run. *Med Sci Sports Exerc*, 38(1), 72-80.
- Matusheski, N. V., & Jeffery, E. H. (2001). Comparison of the bioactivity of two glucoraphanin hydrolysis products found in broccoli, sulforaphane and sulforaphane nitrile. *J Agric Food Chem*, 49(12), 5743-5749.
- McCord, J. M. (2000). The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med*, 108(8), 652-659.
- McMahon, M., Itoh, K., Yamamoto, M., Chanas, S. A., Henderson, C. J., McLellan, L. I., et al. (2001). The Cap'n'Collar basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (NF-E2 p45-related factor 2) controls both constitutive and inducible expression of intestinal detoxification and glutathione biosynthetic enzymes. *Cancer Res*, 61(8), 3299-3307.
-

-
- McMahon, M., Itoh, K., Yamamoto, M., & Hayes, J. D. (2003). Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression. *J Biol Chem*, 278(24), 21592-21600.
- McNaughton, S. A., & Marks, G. C. (2003). Development of a food composition database for the estimation of dietary intakes of glucosinolates, the biologically active constituents of cruciferous vegetables. *Br J Nutr*, 90(3), 687-697.
- McWalter, G. K., Higgins, L. G., McLellan, L. I., Henderson, C. J., Song, L., Thornalley, P. J., et al. (2004). Transcription factor Nrf2 is essential for induction of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1, glutathione S-transferases, and glutamate cysteine ligase by broccoli seeds and isothiocyanates. *J Nutr*, 134(12 Suppl), 3499S-3506S.
- Meister, A., & Anderson, M. E. (1983). Glutathione. *Annu Rev Biochem*, 52, 711-760.
- Mitscher, L. A., Jung, M., Shankel, D., Dou, J. H., Steele, L., & Pillai, S. P. (1997). Chemoprotection: a review of the potential therapeutic antioxidant properties of green tea (*Camellia sinensis*) and certain of its constituents. *Med Res Rev*, 17(4), 327-365.
- Moi, P., Chan, K., Asunis, I., Cao, A., & Kan, Y. W. (1994). Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(21), 9926-9930.
- Moinova, H. R., & Mulcahy, R. T. (1998). An electrophile response element (EpRE) regulates beta-naphthoflavone induction of the human gamma-glutamylcysteine synthetase regulatory subunit gene. Constitutive expression is mediated by an adjacent AP-1 site. *J Biol Chem*, 273(24), 14683-14689.
- Molavi, B., & Mehta, J. L. (2004). Oxidative stress in cardiovascular disease: molecular basis of its deleterious effects, its detection, and therapeutic considerations. *Curr Opin Cardiol*, 19(5), 488-493.
- Moon, S. K., Cho, G. O., Jung, S. Y., Gal, S. W., Kwon, T. K., Lee, Y. C., et al. (2003). Quercetin exerts multiple inhibitory effects on vascular smooth muscle cells: role of ERK1/2, cell-cycle regulation, and matrix metalloproteinase-9. *Biochem Biophys Res Commun*, 301(4), 1069-1078.
- Motohashi, H., Shavit, J. A., Igarashi, K., Yamamoto, M., & Engel, J. D. (1997). The world according to Maf. *Nucleic Acids Res*, 25(15), 2953-2959.
- Mukherjee, S., Gangopadhyay, H., & Das, D. K. (2008). Broccoli: A Unique Vegetable That Protects Mammalian Hearts through the Redox Cycling of the Thioredoxin Superfamily. *J Agric Food Chem*, 56(2), 609-617.
- Mulcahy, R. T., Wartman, M. A., Bailey, H. H., & Gipp, J. J. (1997). Constitutive and beta-naphthoflavone-induced expression of the human gamma-glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene is regulated by a distal antioxidant response element/TRE sequence. *J Biol Chem*, 272(11), 7445-7454.
- Munday, R., & Munday, C. M. (2004). Induction of phase II detoxification enzymes in rats by plant-derived isothiocyanates: comparison of allyl isothiocyanate with sulforaphane and related compounds. *J Agric Food Chem*, 52(7), 1867-1871.
- Myzak, M. C., Karplus, P. A., Chung, F. L., & Dashwood, R. H. (2004). A novel mechanism of chemoprotection by sulforaphane: inhibition of histone deacetylase. *Cancer Res*, 64(16), 5767-5774.
- Nader, G. A., & Esser, K. A. (2001). Intracellular signaling specificity in skeletal muscle in response to different modes of exercise. *J Appl Physiol*, 90(5), 1936-1942.
- Nakamura, H., Nakamura, K., & Yodoi, J. (1997). Redox regulation of cellular activation. *Annu Rev Immunol*, 15, 351-369.
- Nakashima, I., Takeda, K., Kawamoto, Y., Okuno, Y., Kato, M., & Suzuki, H. (2005). Redox control of catalytic activities of membrane-associated protein tyrosine kinases. *Arch Biochem Biophys*, 434(1), 3-10.
- Newman, G. W., Balcewicz-Sablinska, M. K., Guarnaccia, J. R., Remold, H. G., & Silberstein, D. S. (1994). Opposing regulatory effects of thioredoxin and eosinophil cytotoxicity-enhancing factor on the development of human immunodeficiency virus 1. *J Exp Med*, 180(1), 359-363.
- Ney, P. A., Andrews, N. C., Jane, S. M., Safer, B., Purucker, M. E., Weremowicz, S., et al. (1993). Purification of the human NF-E2 complex: cDNA cloning of the hematopoietic cell-specific subunit and evidence for an associated partner. *Mol Cell Biol*, 13(9), 5604-5612.
- Nguyen, T., Huang, H. C., & Pickett, C. B. (2000). Transcriptional regulation of the antioxidant response element. Activation by Nrf2 and repression by MafK. *J Biol Chem*, 275(20), 15466-15473.
-

-
- Nguyen, T., Rushmore, T. H., & Pickett, C. B. (1994). Transcriptional regulation of a rat liver glutathione S-transferase Ya subunit gene. Analysis of the antioxidant response element and its activation by the phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *J Biol Chem*, 269(18), 13656-13662.
- Nguyen, T., Sherratt, P. J., Nioi, P., Yang, C. S., & Pickett, C. B. (2005). Nrf2 controls constitutive and inducible expression of ARE-driven genes through a dynamic pathway involving nucleocytoplasmic shuttling by Keap1. *J Biol Chem*, 280(37), 32485-32492.
- Nohl, H., Breuninger, V., & Hegner, D. (1978). Influence of mitochondrial radical formation on energy-linked respiration. *Eur J Biochem*, 90(2), 385-390.
- Ogonovszky, H., Sasvari, M., Dosek, A., Berkes, I., Kaneko, T., Tahara, S., et al. (2005). The effects of moderate, strenuous, and overtraining on oxidative stress markers and DNA repair in rat liver. *Can J Appl Physiol*, 30(2), 186-195.
- Okawa, H., Motohashi, H., Kobayashi, A., Aburatani, H., Kensler, T. W., & Yamamoto, M. (2006). Hepatocyte-specific deletion of the keap1 gene activates Nrf2 and confers potent resistance against acute drug toxicity. *Biochem Biophys Res Commun*, 339(1), 79-88.
- Oyake, T., Itoh, K., Motohashi, H., Hayashi, N., Hoshino, H., Nishizawa, M., et al. (1996). Bach proteins belong to a novel family of BTB-basic leucine zipper transcription factors that interact with MafK and regulate transcription through the NF-E2 site. *Mol Cell Biol*, 16(11), 6083-6095.
- Paffenbarger, R. S., Jr., Hyde, R. T., Wing, A. L., Lee, I. M., Jung, D. L., & Kampert, J. B. (1993). The association of changes in physical-activity level and other lifestyle characteristics with mortality among men. *N Engl J Med*, 328(8), 538-545.
- Pahl, H. L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*, 18(49), 6853-6866.
- Pattwell, D. M., McArdle, A., Morgan, J. E., Patridge, T. A., & Jackson, M. J. (2004). Release of reactive oxygen and nitrogen species from contracting skeletal muscle cells. *Free Radic Biol Med*, 37(7), 1064-1072.
- Payen, L., Courtois, A., Loewert, M., Guillouzo, A., & Fardel, O. (2001). Reactive oxygen species-related induction of multidrug resistance-associated protein 2 expression in primary hepatocytes exposed to sulforaphane. *Biochem Biophys Res Commun*, 282(1), 257-263.
- Peake, J., Nosaka, K., & Suzuki, K. (2005). Characterization of inflammatory responses to eccentric exercise in humans. *Exerc Immunol Rev*, 11, 64-85.
- Perry, G. (2005). *Alzheimer as a disease of metabolic demand: benefits of physical and brain exercise*. (Meyer Meyer Sport ed.). Oxford.
- Petri, N., Tannergren, C., Holst, B., Mellon, F. A., Bao, Y., Plumb, G. W., et al. (2003). Absorption/metabolism of sulforaphane and quercetin, and regulation of phase II enzymes, in human jejunum in vivo. *Drug Metab Dispos*, 31(6), 805-813.
- Pink, J. J., Planchon, S. M., Tagliarino, C., Varnes, M. E., Siegel, D., & Boothman, D. A. (2000). NAD(P)H:Quinone oxidoreductase activity is the principal determinant of beta-lapachone cytotoxicity. *J Biol Chem*, 275(8), 5416-5424.
- Pompella, A., Visvikis, A., Paolicchi, A., De Tata, V., & Casini, A. F. (2003). The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol*, 66(8), 1499-1503.
- Powers, S. K., Criswell, D., Lawler, J., Ji, L. L., Martin, D., Herb, R. A., et al. (1994). Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. *Am J Physiol*, 266(2 Pt 2), R375-380.
- Powis, G., Bonjouklian, R., Berggren, M. M., Gallegos, A., Abraham, R., Ashendel, C., et al. (1994). Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase. *Cancer Res*, 54(9), 2419-2423.
- Powis, G., Briehl, M., & Oblong, J. (1995). Redox signalling and the control of cell growth and death. *Pharmacol Ther*, 68(1), 149-173.
- Prawan, A., Kundu, J. K., & Surh, Y. J. (2005). Molecular basis of heme oxygenase-1 induction: implications for chemoprevention and chemoprotection. *Antioxid Redox Signal*, 7(11-12), 1688-1703.
- Prester, T., & Talalay, P. (1995). Electrophile and antioxidant regulation of enzymes that detoxify carcinogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(19), 8965-8969.
- Prochaska, H. J., De Long, M. J., & Talalay, P. (1985). On the mechanisms of induction of cancer-protective enzymes: a unifying proposal. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(23), 8232-8236.
- Prochaska, H. J., & Talalay, P. (1988). Regulatory mechanisms of monofunctional and bifunctional anticarcinogenic enzyme inducers in murine liver. *Cancer Res*, 48(17), 4776-4782.
-

-
- Prochaska, H. J., Talalay, P., & Sies, H. (1987). Direct protective effect of NAD(P)H:quinone reductase against menadione-induced chemiluminescence of postmitochondrial fractions of mouse liver. *J Biol Chem*, 262(5), 1931-1934.
- Radak, Z., Apor, P., Pucsok, J., Berkes, I., Ogonovszky, H., Pavlik, G., et al. (2003). Marathon running alters the DNA base excision repair in human skeletal muscle. *Life Sci*, 72(14), 1627-1633.
- Radak, Z., Chung, H. Y., Koltai, E., Taylor, A. W., & Goto, S. (2007). Exercise, oxidative stress and hormesis. *Ageing Res Rev*.
- Radak, Z., Sasvari, M., Nyakas, C., Pucsok, J., Nakamoto, H., & Goto, S. (2000). Exercise preconditioning against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in proteins of rat myocardium. *Arch Biochem Biophys*, 376(2), 248-251.
- Radak, Z., Taylor, A. W., Ohno, H., & Goto, S. (2001). Adaptation to exercise-induced oxidative stress: from muscle to brain. *Exerc Immunol Rev*, 7, 90-107.
- Radjendirane, V., Joseph, P., Lee, Y. H., Kimura, S., Klein-Szanto, A. J., Gonzalez, F. J., et al. (1998). Disruption of the DT diaphorase (NQO1) gene in mice leads to increased menadione toxicity. *J Biol Chem*, 273(13), 7382-7389.
- Reid, M. B., Haack, K. E., Franchek, K. M., Valberg, P. A., Kobzik, L., & West, M. S. (1992). Reactive oxygen in skeletal muscle. I. Intracellular oxidant kinetics and fatigue in vitro. *J Appl Physiol*, 73(5), 1797-1804.
- Ritz, S. A., Wan, J., & Diaz-Sanchez, D. (2007). Sulforaphane-stimulated phase II enzyme induction inhibits cytokine production by airway epithelial cells stimulated with diesel extract. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 292(1), L33-39.
- Rogers, L. K., Tamura, T., Rogers, B. J., Welty, S. E., Hansen, T. N., & Smith, C. V. (2004). Analyses of glutathione reductase hypomorphic mice indicate a genetic knockout. *Toxicol Sci*, 82(2), 367-373.
- Rubartelli, A., Bajetto, A., Allavena, G., Wollman, E., & Sitia, R. (1992). Secretion of thioredoxin by normal and neoplastic cells through a leaderless secretory pathway. *J Biol Chem*, 267(34), 24161-24164.
- Rushmore, T. H., Morton, M. R., & Pickett, C. B. (1991). The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *J Biol Chem*, 266(18), 11632-11639.
- Rushmore, T. H., & Pickett, C. B. (1990). Transcriptional regulation of the rat glutathione S-transferase Ya subunit gene. Characterization of a xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by phenolic antioxidants. *J Biol Chem*, 265(24), 14648-14653.
- Russ, D. W., & Lovering, R. M. (2006). Influence of activation frequency on cellular signalling pathways during fatiguing contractions in rat skeletal muscle. *Exp Physiol*, 91(6), 957-966.
- Ryter, S. W., & Tyrrell, R. M. (2000). The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radic Biol Med*, 28(2), 289-309.
- Sahlin, K., Cizinsky, S., Warholm, M., & Hoberg, J. (1992). Repetitive static muscle contractions in humans--a trigger of metabolic and oxidative stress? *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 64(3), 228-236.
- Sastre, J., Asensi, M., Gasco, E., Pallardo, F. V., Ferrero, J. A., Furukawa, T., et al. (1992). Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: prevention by antioxidant administration. *Am J Physiol*, 263(5 Pt 2), R992-995.
- Scharf, G., Prustomersky, S., Knasmuller, S., Schulte-Hermann, R., & Huber, W. W. (2003). Enhancement of glutathione and g-glutamylcysteine synthetase, the rate limiting enzyme of glutathione synthesis, by chemoprotective plant-derived food and beverage components in the human hepatoma cell line HepG2. *Nutr Cancer*, 45(1), 74-83.
- Sen, C. K. (1995). Oxidants and antioxidants in exercise. *J Appl Physiol*, 79(3), 675-686.
- Sen, C. K. (2001). Antioxidants in exercise nutrition. *Sports Med*, 31(13), 891-908.
- Seow, A., Yuan, J. M., Sun, C. L., Van Den Berg, D., Lee, H. P., & Yu, M. C. (2002). Dietary isothiocyanates, glutathione S-transferase polymorphisms and colorectal cancer risk in the Singapore Chinese Health Study. *Carcinogenesis*, 23(12), 2055-2061.
- Shioji, K., & Nakamura, H. (2003). [Thioredoxin and atherosclerosis]. *Rinsho Byori*, 51(11), 1106-1110.
- Shishu, & Kaur, I. P. (2003). Inhibition of mutagenicity of food-derived heterocyclic amines by sulforaphane--a constituent of broccoli. *Indian J Exp Biol*, 41(3), 216-219.
-

-
- Siegel, D., Bolton, E. M., Burr, J. A., Liebler, D. C., & Ross, D. (1997). The reduction of alpha-tocopherolquinone by human NAD(P)H: quinone oxidoreductase: the role of alpha-tocopherolhydroquinone as a cellular antioxidant. *Mol Pharmacol*, 52(2), 300-305.
- Siegel, D., Gibson, N. W., Preusch, P. C., & Ross, D. (1990). Metabolism of diaziquone by NAD(P)H:(quinone acceptor) oxidoreductase (DT-diaphorase): role in diaziquone-induced DNA damage and cytotoxicity in human colon carcinoma cells. *Cancer Res*, 50(22), 7293-7300.
- Siegel, D., & Ross, D. (2000). Immunodetection of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in human tissues. *Free Radic Biol Med*, 29(3-4), 246-253.
- Singh, A. V., Xiao, D., Lew, K. L., Dhir, R., & Singh, S. V. (2004). Sulforaphane induces caspase-mediated apoptosis in cultured PC-3 human prostate cancer cells and retards growth of PC-3 xenografts in vivo. *Carcinogenesis*, 25(1), 83-90.
- Sipowicz, M. A., Chomarat, P., Diwan, B. A., Anver, M. A., Awasthi, Y. C., Ward, J. M., et al. (1997). Increased oxidative DNA damage and hepatocyte overexpression of specific cytochrome P450 isoforms in hepatitis of mice infected with *Helicobacter hepaticus*. *Am J Pathol*, 151(4), 933-941.
- Spangenburg, E. E., Brown, D. A., Johnson, M. S., & Moore, R. L. (2006). Exercise increases SOCS-3 expression in rat skeletal muscle: potential relationship to IL-6 expression. *J Physiol*, 572(Pt 3), 839-848.
- Strange, R. C., Spiteri, M. A., Ramachandran, S., & Fryer, A. A. (2001). Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutat Res*, 482(1-2), 21-26.
- Stringer, M. D., Gorog, P. G., Freeman, A., & Kakkar, V. V. (1989). Lipid peroxides and atherosclerosis. *Bmj*, 298(6669), 281-284.
- Swanson, H. I., Chan, W. K., & Bradfield, C. A. (1995). DNA binding specificities and pairing rules of the Ah receptor, ARNT, and SIM proteins. *J Biol Chem*, 270(44), 26292-26302.
- Swordlow, R. H. (2007). Pathogenesis of Alzheimer's disease. *Clin Interv Aging*, 2(3), 347-359.
- Talalay, P. (2000). Chemoprotection against cancer by induction of phase 2 enzymes. *Biofactors*, 12(1-4), 5-11.
- Talalay, P., & Benson, A. M. (1982). Elevation of quinone reductase activity by anticarcinogenic antioxidants. *Adv Enzyme Regul*, 20, 287-300.
- Talalay, P., Fahey, J. W., Holtzclaw, W. D., Prester, T., & Zhang, Y. (1995). Chemoprotection against cancer by phase 2 enzyme induction. *Toxicol Lett*, 82-83, 173-179.
- Telakowski-Hopkins, C. A., King, R. G., & Pickett, C. B. (1988). Glutathione S-transferase Ya subunit gene: identification of regulatory elements required for basal level and inducible expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(4), 1000-1004.
- Temmink, J. H., Bruggeman, I. M., & van Bladeren, P. J. (1986). Cytomorphological changes in liver cells exposed to allyl and benzyl isothiocyanate and their cysteine and glutathione conjugates. *Arch Toxicol*, 59(2), 103-110.
- Thimmulappa, R. K., Mai, K. H., Srisuma, S., Kensler, T. W., Yamamoto, M., & Biswal, S. (2002). Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. *Cancer Res*, 62(18), 5196-5203.
- Thor, H., Smith, M. T., Hartzell, P., Bellomo, G., Jewell, S. A., & Orrenius, S. (1982). The metabolism of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) by isolated hepatocytes. A study of the implications of oxidative stress in intact cells. *J Biol Chem*, 257(20), 12419-12425.
- Tomimoto, H., Akiguchi, I., Wakita, H., Kimura, J., Hori, K., & Yodoi, J. (1993). Astroglial expression of ATL-derived factor, a human thioredoxin homologue, in the gerbil brain after transient global ischemia. *Brain Res*, 625(1), 1-8.
- Turoczi, T., Chang, V. W., Engelman, R. M., Maulik, N., Ho, Y. S., & Das, D. K. (2003). Thioredoxin redox signaling in the ischemic heart: an insight with transgenic mice overexpressing Trx1. *J Mol Cell Cardiol*, 35(6), 695-704.
- Ursini, F., Maiorino, M., Brigelius-Flohe, R., Aumann, K. D., Roveri, A., Schomburg, D., et al. (1995). Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol*, 252, 38-53.
- Ursini, F., Maiorino, M., & Gregolin, C. (1986). Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Int J Tissue React*, 8(2), 99-103.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 39(1), 44-84.
- van Poppel, G., Verhoeven, D. T., Verhagen, H., & Goldbohm, R. A. (1999). Brassica vegetables and cancer prevention. Epidemiology and mechanisms. *Adv Exp Med Biol*, 472, 159-168.
-

-
- Velichkova, M., & Hasson, T. (2005). Keap1 regulates the oxidation-sensitive shuttling of Nrf2 into and out of the nucleus via a Crml-dependent nuclear export mechanism. *Mol Cell Biol*, 25(11), 4501-4513.
- Venugopal, R., & Jaiswal, A. K. (1996). Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(25), 14960-14965.
- Vina, J., Gimeno, A., Sastre, J., Desco, C., Asensi, M., Pallardo, F. V., et al. (2000). Mechanism of free radical production in exhaustive exercise in humans and rats; role of xanthine oxidase and protection by allopurinol. *IUBMB Life*, 49(6), 539-544.
- Wacey, A. I., Krawczak, M., Kembell-Cook, G., & Cooper, D. N. (1997). Homology modelling of the catalytic domain of early mammalian protein C: evolution of structural features. *Hum Genet*, 101(1), 37-42.
- Wang, L. I., Giovannucci, E. L., Hunter, D., Neuberg, D., Su, L., & Christiani, D. C. (2004). Dietary intake of Cruciferous vegetables, Glutathione S-transferase (GST) polymorphisms and lung cancer risk in a Caucasian population. *Cancer Causes Control*, 15(10), 977-985.
- Wang, W., Wang, S., Howie, A. F., Beckett, G. J., Mithen, R., & Bao, Y. (2005). Sulforaphane, erucin, and iberin up-regulate thioredoxin reductase 1 expression in human MCF-7 cells. *J Agric Food Chem*, 53(5), 1417-1421.
- Whitlock, J. P., Jr. (1999). Induction of cytochrome P4501A1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 39, 103-125.
- Whitmarsh, A. J., & Davis, R. J. (1996). Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med*, 74(10), 589-607.
- Widegren, U., Jiang, X. J., Krook, A., Chibalin, A. V., Bjornholm, M., Tally, M., et al. (1998). Divergent effects of exercise on metabolic and mitogenic signaling pathways in human skeletal muscle. *Faseb J*, 12(13), 1379-1389.
- Wild, A. C., Gipp, J. J., & Mulcahy, T. (1998). Overlapping antioxidant response element and PMA response element sequences mediate basal and beta-naphthoflavone-induced expression of the human gamma-glutamylcysteine synthetase catalytic subunit gene. *Biochem J*, 332 (Pt 2), 373-381.
- Winski, S. L., Koutalos, Y., Bentley, D. L., & Ross, D. (2002). Subcellular localization of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 in human cancer cells. *Cancer Res*, 62(5), 1420-1424.
- Winski, S. L., Swann, E., Hargreaves, R. H., Dehn, D. L., Butler, J., Moody, C. J., et al. (2001). Relationship between NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) levels in a series of stably transfected cell lines and susceptibility to antitumor quinones. *Biochem Pharmacol*, 61(12), 1509-1516.
- Witting, P. K., Pettersson, K., Letters, J., & Stocker, R. (2000). Site-specific antiatherogenic effect of probucol in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20(8), E26-33.
- Wood, Z. A., Schroder, E., Robin Harris, J., & Poole, L. B. (2003). Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci*, 28(1), 32-40.
- Xie, C., Lovell, M. A., Xiong, S., Kindy, M. S., Guo, J., Xie, J., et al. (2001). Expression of glutathione-S-transferase isozyme in the SY5Y neuroblastoma cell line increases resistance to oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 31(1), 73-81.
- Xu, C., Huang, M. T., Shen, G., Yuan, X., Lin, W., Khor, T. O., et al. (2006). Inhibition of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced skin tumorigenesis in C57BL/6 mice by sulforaphane is mediated by nuclear factor E2-related factor 2. *Cancer Res*, 66(16), 8293-8296.
- Yagev, S., Heller, M., & Pinson, A. (1984). Changes in cytoplasmic and lysosomal enzyme activities in cultured rat heart cells: the relationship to cell differentiation and cell population in culture. *In Vitro*, 20(12), 893-898.
- Yamawaki, H., Haendeler, J., & Berk, B. C. (2003). Thioredoxin: a key regulator of cardiovascular homeostasis. *Circ Res*, 93(11), 1029-1033.
- Yanaka, A., Zhang, S., Tauchi, M., Suzuki, H., Shibahara, T., Matsui, H., et al. (2005). Role of the nrf-2 gene in protection and repair of gastric mucosa against oxidative stress. *Inflammopharmacology*, 13(1-3), 83-90.
- Ye, L., Dinkova-Kostova, A. T., Wade, K. L., Zhang, Y., Shapiro, T. A., & Talalay, P. (2002). Quantitative determination of dithiocarbamates in human plasma, serum, erythrocytes and urine: pharmacokinetics of broccoli sprout isothiocyanates in humans. *Clin Chim Acta*, 316(1-2), 43-53.
-

-
- Yoshioka, K., Deng, T., Cavigelli, M., & Karin, M. (1995). Antitumor promotion by phenolic antioxidants: inhibition of AP-1 activity through induction of Fra expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(11), 4972-4976.
- Yoxall, V., Kentish, P., Coldham, N., Kuhnert, N., Sauer, M. J., & Ioannides, C. (2005). Modulation of hepatic cytochromes P450 and phase II enzymes by dietary doses of sulforaphane in rats: Implications for its chemopreventive activity. *Int J Cancer*, 117(3), 356-362.
- Yu, B. P., & Chung, H. Y. (2006). Adaptive mechanisms to oxidative stress during aging. *Mech Ageing Dev*, 127(5), 436-443.
- Yu, M., Blomstrand, E., Chibalin, A. V., Krook, A., & Zierath, J. R. (2001). Marathon running increases ERK1/2 and p38 MAP kinase signalling to downstream targets in human skeletal muscle. *J Physiol*, 536(Pt 1), 273-282.
- Yu, M., Stepto, N. K., Chibalin, A. V., Fryer, L. G., Carling, D., Krook, A., et al. (2003). Metabolic and mitogenic signal transduction in human skeletal muscle after intense cycling exercise. *J Physiol*, 546(Pt 2), 327-335.
- Zhang, D. D., & Hannink, M. (2003). Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Mol Cell Biol*, 23(22), 8137-8151.
- Zhang, D. D., Lo, S. C., Cross, J. V., Templeton, D. J., & Hannink, M. (2004). Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex. *Mol Cell Biol*, 24(24), 10941-10953.
- Zhang, D. D., Lo, S. C., Sun, Z., Habib, G. M., Lieberman, M. W., & Hannink, M. (2005). Ubiquitination of Keap1, a BTB-Kelch substrate adaptor protein for Cul3, targets Keap1 for degradation by a proteasome-independent pathway. *J Biol Chem*, 280(34), 30091-30099.
- Zhang, L. F., Xu, K., & Li, X. M. (1994). [Quantitative study on DNA-adduct in normal lung tissues of smoking and non-smoking lung cancer patients]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*, 28(4), 206-209.
- Zhang, Y. (2000). Role of glutathione in the accumulation of anticarcinogenic isothiocyanates and their glutathione conjugates by murine hepatoma cells. *Carcinogenesis*, 21(6), 1175-1182.
- Zhang, Y. (2001). Molecular mechanism of rapid cellular accumulation of anticarcinogenic isothiocyanates. *Carcinogenesis*, 22(3), 425-431.
- Zhang, Y., Li, J., & Tang, L. (2005). Cancer-preventive isothiocyanates: dichotomous modulators of oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 38(1), 70-77.
- Zhang, Y., Munday, R., Jobson, H. E., Munday, C. M., Lister, C., Wilson, P., et al. (2006). Induction of GST and NQO1 in cultured bladder cells and in the urinary bladders of rats by an extract of broccoli (*Brassica oleracea italica*) sprouts. *J Agric Food Chem*, 54(25), 9370-9376.
- Zhao, B., Seow, A., Lee, E. J., Poh, W. T., Teh, M., Eng, P., et al. (2001). Dietary isothiocyanates, glutathione S-transferase -M1, -T1 polymorphisms and lung cancer risk among Chinese women in Singapore. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 10(10), 1063-1067.
- Zhou, L. Z., Johnson, A. P., & Rando, T. A. (2001). NF kappa B and AP-1 mediate transcriptional responses to oxidative stress in skeletal muscle cells. *Free Radic Biol Med*, 31(11), 1405-1416.
- Zhu, H., Itoh, K., Yamamoto, M., Zweier, J. L., & Li, Y. (2005). Role of Nrf2 signaling in regulation of antioxidants and phase 2 enzymes in cardiac fibroblasts: protection against reactive oxygen and nitrogen species-induced cell injury. *FEBS Lett*, 579(14), 3029-3036.

Allegato A: Pubblicazioni a Stampa

HPLC-F analysis of melatonin and resveratrol isomers in wine using an SPE procedure.

Laura Mercolini, Maria Addolorata Saracino, Francesca Bugamelli, Anna Ferranti, Marco Malaguti, Silvana Hrelia, Maria Augusta Raggi *J Sep Sci* 2008 [In Press]

Effect of a hyperproteic-PUFA supplemented diet on chemical physical parameters of red blood cell membranes and plasma antioxidant activity in volley athletes.

Marco Malaguti, Marta Baldini, Cristina Angeloni, Pierluigi Biagi and Silvana Hrelia. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*, [In Press]

Role of quercetin in modulating rat cardiomyocyte gene expression profile.

Angeloni C, Leoncini E, Malaguti M, Angelini S, Hrelia P, Hrelia S. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008 Jan 4 [Epub ahead of print]

A critical evaluation of high protein-low carbohydrate diets. M. Malaguti, S. Hrelia, A. Lorenzini, PL, Biagi *Agro Food industry Hi-tech* 5: 7-8 (2007)

Sulforaphane in the protection of cardiomyocytes from oxidative stress. Malaguti

M., Angeloni C., Leoncini E., Pagnotta E., Biagi PL., Hrelia S. *Journal of molecular and Cellular Cardiology* 42 suppl 1; S188 (2007)

Dietary Selenium for the counteraction of oxidative damage: fortified foods or supplements? A. Bordoni, F. Danesi, M. Malaguti, M. Di Nunzio, F. Pasqui, M. Maranesi, P.L. Biagi *Br J Nutr*. 26;1-7. (2007)

Counteraction of adriamycin-induced oxidative damage in rat heart by selenium dietary supplementation.

F. Danesi, M. Malaguti, M. Di Nunzio, M. Maranesi, P.L. Biagi, A. Bordoni. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54; 1203-1208. (2006)

Allegato B: Comunicazioni a Concorsi

Green tea catechins activate Peroxisome Proliferator Activated Receptors (PPARs) in cultured cardiomyocytes: a new role in cardiovascular protection? F. Danesi, M. Di Nunzio, M. Malaguti, M. Maranesi, P.L. Biagi, A. Bordoni 2° Verona International Meeting on Foods, Phytotherapeutic Compounds and Health, Verona (VR) 29-30 settembre 2007

Evaluation of Portable SenseWear® Armband to estimate Resting Energy Expenditure and energy expenditure of treadmill exercise. Marta Baldini, Marco Malaguti, Silvana Hrelia, Pierluigi Biagi. Sport Kinetics 2007-Scientific fundamentals of human and sport practice, (2007)- Belgrade.

Does n-3 PUFA supplementation favour free-radical damage? Different effects of EPA and DHA in cultured cardiomyocytes. A. Bordoni, F. Danesi, M. Di Nunzio, M. Malaguti, M. Maranesi, P.L. Biagi. Incontro di Studio Congiunto Società Italiana di Nutrizione Umana (SINU) - Società Italiana di Biochimica e Biologia Molecolare (SIB), Cesena (FC) 31 maggio - 1 giugno 2007.

Effetti dell'IGF-1 come induttore di stress ossidativi in fibroblasti umani. M. Malaguti, A. Lorenzini, P.L. Biagi, C. Sell. SINU XXXIV Congresso Nazionale "La nutrizione umana oggi tra tecnologia e prevenzione" Riccione (RN) 8-10 Novembre 2006

Catechine del tè verde: oltre l'attività antiossidante? F. Danesi, M. Di Nunzio, M. Malaguti, P.L. Biagi, A. Bordoni. SINU XXXIV Congresso Nazionale "La nutrizione umana oggi tra tecnologia e prevenzione" Riccione (RN) 8-10 Novembre 2006

Increased Longevity in Mice Homozygous for a Hypomorphic Igf-I Allele. Antonello Lorenzini, Marco Malaguti, Roger McCarter, Yuji Ikeno, Edward Masoro, Mantao Liu, Christian Sell. Nathan Shock Aging Center Conference on Aging: Nutrient Signaling and Aging, San Antonio, Oct. 12-15, 2006

Influenza del congelamento e di diverse tecniche di cottura sull'attività antiossidante di alimenti vegetali. F. Danesi, M. Malaguti, M. Di Nunzio, P.L. Biagi, A. Bordoni. 1° Convegno Nazionale Associazione Ricercatori Nutrizione Alimenti (ARNA), Ozzano dell'Emilia (BO) 23-25 marzo 2006.

Marker plasmatici di attività antiossidante come possibile segno diagnostico di diabete. F. Danesi, A.M. Bargossi, M. Malaguti, M. Di Nunzio, A. Bordoni, P.L. Biagi. 1° Convegno Nazionale Associazione Ricercatori Nutrizione Alimenti (ARNA), Ozzano dell'Emilia (BO) 23-25 marzo 2006.

Modifiche della composizione acilica in cellule cardiache supplementate con EPA e DHA. M. Di Nunzio, M. Malaguti, F. Danesi, P.L. Biagi, A. Bordoni. 1° Convegno

Nazionale Associazione Ricercatori Nutrizione Alimenti (ARNA), Ozzano dell'Emilia (BO) 23-25 marzo 2006.

Effetto protettivo a livello cardiaco di una moderata supplementazione dietetica di selenio. F. Danesi, M. Malaguti, M. Di Nunzio, M. Maranesi, P.L. Biagi, A. Bordoni

SINU XXXIII Congresso nazionale "Sinergie e attualità in nutrizione" Montesilvano (PE) 6-8 Ottobre 2005

Un approccio ludico al rilevamento delle frequenze di consumo di alimenti. M. Malaguti, M. Baldini, F. Pasqui, M. Maranesi. SINU XXXIII Congresso nazionale "Sinergie e attualità in nutrizione" Montesilvano (PE) 6-8 Ottobre 2005

L'alimentazione dell'adolescente che pratica attività sportiva: confronto tra realtà italiana e rumena. F. Pasqui, M. Baldini, M. Malaguti, M. Maranesi, R. Miroui, M. Di Carlo SINU XXXIII Congresso nazionale "Sinergie e attualità in nutrizione" Montesilvano (PE) 6-8 Ottobre 2005

Protection against adriamycin induced cardioprototoxicity by selenium dietary supplementation. A. Bordoni, F. Danesi, M. Malaguti, M. Di Nunzio, M. Maranesi, P.L. Biagi 50° congresso nazionale SIB Riccione (RN) 27-30 Settembre 2005

Parametri strutturali di membrane eritrocitarie ed attività antiossidante plasmatica totale di atleti sottoposti a diversi regimi dietetici. Malaguti M., Angeloni C., Hrelia S., Biagi P. Il Convegno Internazionale: " Il ruolo dell'esercizio fisico nella prevenzione delle malattie e nel miglioramento della qualità della vita. Rimini 28-30 Maggio 2005.

