



1506
UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI URBINO
CARLO BO

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI URBINO CARLO BO
Dipartimento di Scienze Biomolecolari

Corso di dottorato di ricerca in
Scienze della Vita, Salute e Biotecnologie
Ciclo XXIX

Valutazione dell'attività biologica e citoprotettiva della
ficocianina da *Aphanizomenon flos-aquae* in colture
cellulari miogeniche ed endoteliali esposte a stress
ossidativo o stimoli pro-infiammatori

Settore Scientifico Disciplinare (SSD): BIO-14

Relatore:
Chiar.mo Prof. PIERO SESTILI

Correlatore:
Dott. Ric. EVELIN COLOMBO

Dottorando:
Dott.ssa ANNA RITA DIAZ

Ai miei genitori, perché in tutto ciò che faccio ci siete voi. Grazie per la forza ed il coraggio che mi avete dato, se sono arrivata fin qui è merito vostro. Non smettete mai di starmi accanto. Un bacio fino al cielo...

INDICE

Abbreviazioni.....	4
Abstract	6
Riassunto.....	8
1. INTRODUZIONE.....	10
1.1 STRESS OSSIDATIVO E SPECIE REATTIVE DELL'OSSIGENO	10
1.1.1 Sistemi di antiossidanti endogeni e loro meccanismi d'azione.....	13
1.1.2 Altre fonti antiossidanti.....	14
1.2 L'INFIAMMAZIONE.....	16
1.2.1 Le malattie infiammatorie.....	22
1.2.2 Ruolo dei microRNA nell'infiammazione.....	23
1.3 IL MUSCOLO SCHELETRICO.....	26
1.3.1 La miogenesi.....	27
1.3.2 Stress ossidativo e infiammazione: impatto sul muscolo scheletrico.....	29
1.4 I CIANOBATTERI.....	31
1.4.1 Caratteristiche cellulari e strutturali dei cianobatteri.....	32
1.4.2 Associazione delle ficobiline nelle principali PBP.....	35
1.4.3 Cianobatteri e nutraceutica.....	37
1.5 APHANIZOMENON FLOS-AQUAE COME SUPPLEMENTO NUTRIZIONALE.....	39
1.5.1 Caratteristiche strutturali di AFA.....	40
1.6 PRINCIPALI CARATTERISTICHE ED ATTIVITÀ BIOLOGICHE DELLE PC.....	42
2. SCOPO DELLA RICERCA.....	46
3. MATERIALI E METODI	47
3.1 PRINCIPALI REAGENTI E COMPOSTI CHIMICI USATI.....	47
3.2 PREPARAZIONE DELL'ESTRATTO e-PC.....	47
3.3 COLTURE CELLULARI.....	48
3.4 CONDIZIONI DI TRATTAMENTO.....	48
3.5 DETERMINAZIONE DELLA VITALITÀ CELLULARE E DELL'ATTIVITÀ MITOCONDRIALE.....	50
3.6 VALUTAZIONE DEL DANNO AL DNA.....	50
3.7 SAGGIO DELLA CAPACITÀ CHELANTE DEL FERRO.....	51
3.8 SAGGIO DI ADESIVITÀ CELLULARE.....	51

3.9 ISOLAMENTO DELL’RNA E PCR QUANTITATIVA REAL TIME (qRT-PCR) DI miRNA MATURI.....	52
3.10 PCR QUANTITATIVA REAL TIME (qRT-PCR) DI mRNA MATURI.....	53
3.11 SAGGIO DELLA B-GALATTOSIDASI ASSOCIATA ALLA SENESCENZA CELLULARE	54
3.12 SAGGIO DI IMMUNOASSORBIMENTO LEGATO AD ENZIMA (ELISA) PER LA VALUTAZIONE DELL’ESPRESSIONE DI VCAM-1	54
3.13 MISURAZIONE DEL DIAMETRO DEI MIOTUBI	55
3.14 ESTRAZIONE DELLE PROTEINE, ELETTROFORESI E WESTERN BLOT	55
3.15 SAGGIO DELLA MIGRAZIONE CELLULARE NELLA RIMARGINAZIONE DI GRAFFI AL MONOSTRATO....	56
3.16 ANALISI STATISTICA	57
4. RISULTATI.....	58
4.1 PREPARAZIONE DELL’ESTRATTO e-PC	58
4.2 CARATTERIZZAZIONE DEL PROFILO TOSSICOLOGICO DI e-PC	60
4.3 VALUTAZIONE DELL’ATTIVITÀ CITOPROTETTIVA DI e-PC	61
4.3.1 Attività citoprotettiva di e-PC in U937	61
4.3.2 Attività citoprotettiva di e-PC in C2C12.....	63
4.3.3 Attività citoprotettiva di e-PC in HUVEC.....	66
4.4 VALUTAZIONE DELL’EFFETTO GENOPROTETTIVO	67
4.5 VALUTAZIONE DELLA CAPACITÀ CHELANTE DEL FERRO	68
4.6 MODULAZIONE DEI miR-146a E miR-126 IN UN MODELLO INFIAMMATORIO ENDOTELIALE	70
4.7 MODULAZIONE DELL’ESPRESSIONE DELLA PROTEINA VCAM	72
4.8 VALUTAZIONE DEL LIVELLO DI ADESIVITÀ CELLULARE	73
4.9 VALUTAZIONE DEL DIAMETRO DEI MIOTUBI ESPOSTI AD LPS ED e-PC	76
4.10 ESPRESSIONE DI miR-146a IN MIOTUBI ESPOSTI AD LPS ED e-PC.....	77
4.11 EFFETTO DI e-PC SULLA MIGRAZIONE CELLULARE INDOTTA DA LPS	78
5. DISCUSSIONE	81
6. CONCLUSIONI.....	88
BIBLIOGRAFIA	90

Abbreviazioni

AFA	Aphanizomenon flos-aquae Ralfs Ex Born. & Flah. Var. flos aquae
APC	Alloficocianina
COX	Ciclossigenasi
DifD	Differentiation Days, giorni dall'induzione del differenziamento
DM	Differentiation Medium, terreno di differenziamento
eNOS	NO sintasi endoteliale
GM	Growth Medium, terreno di crescita
GSH	Glutathione (forma ridotta)
ICAM-1	Inta-Cellular Adhesion Molecule-1, molecola di adesione intracellulare-1
IGF-1	Fattore di crescita insulino-simile
IL-1	Interleuchina-1
IL-6	Interleuchina-6
iNOS	NO sintasi inducibile
IRAK-1	IL-1 Receptor Activated Kinase, recettore di IL-1 attivato da chinasi
IκB	Fattore di inibizione di κB
IKK	Chinasi di IκB
LDH	Lattato deidrogenasi
LPS	Lipopolisaccaride
MAPK	Proteina chinasi attivata da mitogeni
MyHC	Myosin Heavy Chain, catena pesante della miosina
MRF	Fattori di regolazione miogenica
MTT	Bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NF-κB	Fattore di trascrizione nucleare di κB
nNOS	NO sintasi nucleare

NOAEL	Dose senza effetto avverso osservabile
NOS	NO sintasi
PBP	Ficobiliproteine
PC	Ficocianina
PCA	Ficocianina da AFA
PCS	Ficocianina da Spirulina
PE	Ficoeritrina
PEC	Ficoeritrocianina
PRR	Pattern Recognition Receptors, recettori di riconoscimento dei segnali infiammatori
RNS	Specie reattive dell'azoto
ROS	Specie reattive dell'ossigeno
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome, sindrome della risposta infiammatoria sistemica
SOD	Superossido dismutasi
tBOOH	Terz-butil idroperossido
TIR	Dominio comune al recettore TLR ed IL-1
TLR	Recettore Toll-Like
TNF- α	Fattore di necrosi tumorale α
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1, molecola di adesione vascolare-1

Abstract

In the last few years, nutraceuticals have been receiving increased interest due to their potential nutritional and therapeutic effects. They might have a role in several biological processes, such as antioxidant and anti-inflammatory responses and the safeguarding of mitochondrial integrity. Thus, nutraceuticals may be used to prevent chronic diseases where oxidative stress, inflammatory mechanisms or lipid peroxidation play an etiological role. *Aphanizomenon flos-aquae* (AFA) is a blue-green edible microalgae (cyanophyta) that grows wildy in Klamath Lake, Oregon. AFA is known to be rich in nutrients such as vitamins, minerals, proteins and enzymes that make it a superfood used as nutrition supplement. In particular, AFA is rich in phycocyanin (PCA). Phycocyanins (PCs) are photosynthetic blue pigments with antioxidant, anti-inflammatory and immunomodulatory activities. However, with the exception of the articles by some authors, these properties have been studied in the PCs from other microalgae, and not in PC from AFA (PCA). The principal goal of this study was to evaluate, for the first time, the cytoprotective/antioxidant effect induced by an aqueous extract of AFA rich in PCA (called e-PC) on C2C12 murine myoblasts as a model of skeletal muscle as well as in two human promonocytic and endothelial cell lines, namely U937 and HUVEC. We analysed the effects of e-PC on cell survival in the three cell lines and on the myogenic capacity of C2C12 myoblasts following oxidative stress caused by acute exposure to the radical generating agents H₂O₂ and tBOOH.

Indeed, oxidative stress is known to trigger and/or participate to a wide number of toxic and pathophysiological pathways/responses, such as the differentiative imbalance of progenitor cells such as myoblasts, apoptosis and inflammation in virtually all cell types and tissues. Notably, inflammation is causally involved in a plethora of diseases including myopathies. Thus, another aim of this project was to investigate the capacity of e-PC to modulate relevant *in vitro* molecular and functional markers of inflammation in endothelial cells (HUVEC) and in C2C12 myotubes, both stimulated with LPS. The adhesion capacity and the modulation of miR-126, miR-146a, IL-6, IRAK-1, VCAM-1 and ICAM-1 were determined in HUVEC, the myotube diameter and the modulation of miR-146a were studied in C2C12 mature myotubes.

Briefly, e-PC displayed a mild antioxidant activity since it reduced the extent of cell death caused by both oxidants (more active vs tBOOH than vs H₂O₂ toxicity) in C2C12 cells as well as in U937 and HUVEC cells, suggesting that the effect lacks cell-type specificity. e-PC antioxidant activity is likely due to its intracellular metal chelating ability, a property capable of inhibiting the radical generating Haber–Weiss reaction. These results suggest that e-PC has some potential as an antioxidant, although in cellular systems its presumably low bioavailability due to the high molecular weight represents a limiting factor.

Interestingly, e-PC was shown to strongly inhibit inflammation induced by LPS. Indeed, our findings showed that e-PC effectively reduces LPS-induced mRNA expression of VCAM-1, ICAM-1, IL-6 and IRAK-1, significantly down-regulates VCAM-1 protein expression and consistently prevents the down-regulation of miR-126 expression caused by LPS in HUVEC cells. A tendencial up-regulation of miR-146a was found in HUVEC, an effect conceivable with an anti-inflammatory activity. In addition, e-PC remarkably reduced U937 cell adhesion to LPS-induced HUVEC in a dose-dependent manner. As to C2C12 myotubes, e-PC prevented the reduction of myotube diameter and prevented miR-146a expression induced by LPS. Taken together, these results demonstrate that e-PC has a mild antioxidant potential but, more importantly, it inhibits relevant markers of myotube and endothelial LPS-induced inflammation at strikingly low concentration, far below those required for antioxidant activity. Thus, AFA and/or AFA-e-PC could be used in superfood preparations for the adjunctive management of inflammatory diseases. Further studies are needed to gain a better understanding of the e-PC mechanism of action and their results could pave the way to a possible use of e-PC as an anti-inflammatory drug which, at this stage, may be exploited in inflammatory conditions sensitive to topical treatments.

Riassunto

Negli ultimi anni i nutraceutici stanno ricevendo sempre più interesse per i loro potenziali effetti terapeutici e nutrizionali. Essi potrebbero avere un ruolo in diversi processi, come nelle risposte antiossidanti ed anti-infiammatorie e nella salvaguardia dell'integrità mitocondriale. Pertanto, i nutraceutici possono essere utilizzati per prevenire delle patologie dove lo stress ossidativo, i meccanismi infiammatori o la perossidazione lipidica giocano un ruolo eziologico. *Aphanizomenon flos-aquae* (AFA) è una microalga verde-azzurra (cyanophyta) edibile che cresce spontaneamente nel lago Klamath, in Oregon. È noto come questa microalga sia ricca in nutrienti, vitamine, minerali, proteine ed enzimi che ne fanno un "supercibo" usato come supplemento nutrizionale. In particolare, AFA è ricca di una specifica ficocianina (PCA, paragrafo 1.5.1). Le ficocianine (PC) sono pigmenti fotosintetici di colore blu con attività antiossidanti, anti-infiammatorie ed immunomodulanti. Tuttavia, ad eccezione degli articoli di alcuni autori, queste proprietà sono state studiate in PC estratta da altre microalghe e non da AFA. L'obiettivo principale di questo lavoro è stato quello di verificare per la prima volta l'effetto citoprotettivo/antiossidante indotto da un estratto acquoso di AFA ricco in PCA (chiamato e-PC) in C2C12, mioblasti murini usati come modello cellulare di muscolo scheletrico, così come in altre due linee cellulari umane, promonocitiche ed endoteliali, rispettivamente U937 e HUVEC. Abbiamo analizzato l'effetto di e-PC sulla vitalità delle tre linee cellulari e sulla capacità differenziativa delle C2C12 in seguito ad insulto ossidativo indotto dall'esposizione ad agenti in grado di generare radicali, come H₂O₂ e tBOOH.

Infatti, lo stress ossidativo innesca e/o partecipa ad un ampio numero di *pathway*/risposte tossiche e fisiopatologiche come lo squilibrio differenziativo dei progenitori dei mioblasti, l'apoptosi e l'infiammazione in tutti i tipi di cellule e tessuti. In particolare, l'infiammazione è coinvolta in una serie di patologie tra cui le miopatie. Così, un altro obiettivo di questo progetto è stato quello di investigare la capacità di e-PC di modulare *in vitro* importanti marcatori *downstream* dell'infiammazione presenti sia nei nelle cellule HUVEC e nei miotubi delle C2C12, entrambi stimolati con LPS. Per le HUVEC è stata verificata la capacità di adesione e di modulazione di miR-126, miR-146a, IL-6, IRAK-1, VCAM-1 e ICAM-1, mentre per i miotubi maturi delle C2C12 è stato analizzato il diametro dei miotubi e la modulazione del miR-146a.

In breve, e-PC ha mostrato una limitata attività antiossidante in quanto riduce l'entità della morte cellulare causata da entrambi gli ossidanti (più attiva nei confronti della tossicità del tBOOH che del H₂O₂) sia nelle C2C12 che nelle altre linee cellulari utilizzate (U937 e HUVEC), suggerendo che l'effetto manca di specificità cellulare. L'attività antiossidante di e-PC è probabilmente dovuta alla sua capacità di chelare i metalli, una proprietà in grado di inibire la generazione dei radicali prodotta dalla reazione di Haber-Weiss. Questi risultati suggeriscono che e-PC ha un potenziale d'azione antiossidante, sebbene nei sistemi cellulari la sua scarsa biodisponibilità, maggiormente dovuta al suo alto peso molecolare, rappresenti un fattore limitante.

In maniera interessante, e-PC inibisce efficacemente l'infiammazione indotta da LPS. Infatti i nostri risultati sulle HUVEC hanno mostrato che e-PC riduce l'espressione degli mRNA di VCAM-1, ICAM-1, IL-6 e IRAK-1 indotta da LPS, riduce significativamente l'espressione della proteina VCAM-1 e al contrario previene la riduzione dell'espressione di miR-126 causata dal LPS. È stato trovato un tendenziale incremento dell'espressione del miR-146a nelle HUVEC trattate con e-PC, un effetto compatibile con l'attività anti-infiammatoria. Inoltre, e-PC riduce notevolmente ed in maniera dose-dipendente l'adesione indotta dall'LPS delle U937 sulle HUVEC. Nei miotubi, e-PC ha prevenuto la riduzione del loro diametro e ridotto l'espressione del miR-146a indotta dall'LPS. Complessivamente questi risultati dimostrano che e-PC ha una blanda attività antiossidante ma, molto più importante, inibisce particolari marcatori dell'infiammazione indotti da LPS nei miotubi e nelle cellule endoteliali a concentrazioni sorprendentemente basse, di gran lunga inferiori a quelle richieste per l'attività antiossidante. Così AFA e/o e-PC estratto da AFA potrebbero essere usati come preparazioni alimentari adiuvanti nella gestione di malattie infiammatorie. Ulteriori studi sono necessari per meglio comprendere il meccanismo d'azione di e-PC, i cui risultati potrebbero aprire la strada ad un suo possibile utilizzo come farmaco anti-infiammatorio. Allo stato attuale e-PC potrebbe essere sfruttato in condizioni infiammatorie sensibili a trattamenti topici.

1. INTRODUZIONE

1.1 STRESS OSSIDATIVO E SPECIE REATTIVE DELL'OSSIGENO

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS), sono molecole radicaliche e non, generalmente a basso peso molecolare, caratterizzate da un'elevata reattività e prodotte da diversi processi endogeni e/o esogeni tossici e patologici dove giocano un ruolo concausale. Tali specie comprendono il radicale superossido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), il radicale idrossile (HO^{\cdot}), il radicale perossilico (ROO^{\cdot}), il perossido di idrogeno (H_2O_2), il radicale diossido di azoto (NO_2^{\cdot}) ed il radicale perossinitrito (ONOO^-) e il nitrossido (NO), più rilevante come precursore degli ultimi due che come vero e proprio radicale [1, 2]. I ROS, possono comportarsi sia da accettori che da donatori di elettroni, quindi sia da riducenti che da ossidanti. Proprio la loro elevata reattività, è responsabile dei danni indotti a particolari strutture biologiche come le membrane cellulari, proteine, lipidi e soprattutto DNA. In condizioni fisiologiche la produzione dei ROS è efficacemente bilanciata dalla loro corretta detossificazione.

Quando tale equilibrio è sbilanciato a favore dei ROS, si parla di "stress ossidativo" [3]. Le principali fonti endogene della loro produzione sono i mitocondri, la xantina ossidasi, la NADPH ossidasi, i perossisomi ed il citocromo P450. Tra i processi endogeni nel quale sono coinvolti rientrano il metabolismo aerobico, la fagocitosi, l'esercizio fisico, l'infiammazione ed il danno da ischemia/riperfusionazione [4-7]. Tra le fonti esogene dei ROS rientrano invece il fumo di sigaretta, farmaci, pesticidi, raggi UV, radiazioni ionizzanti e solventi industriali [8-11] (Figura 1)

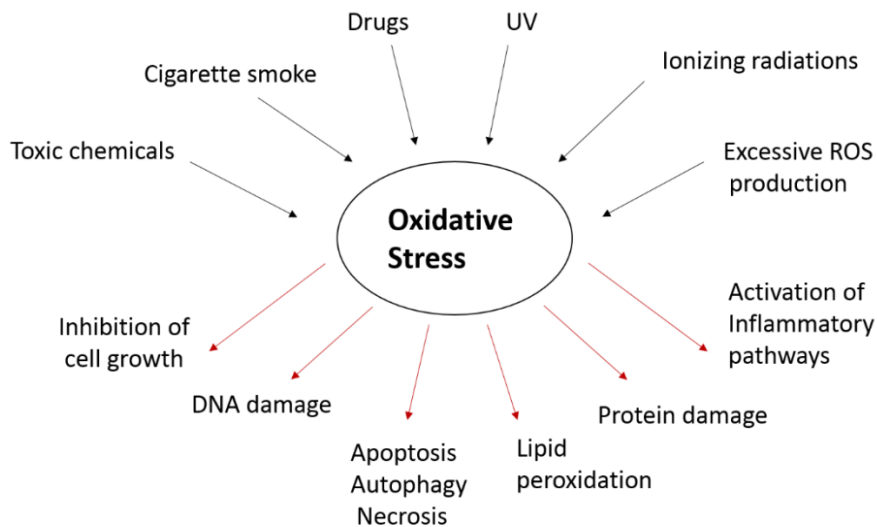
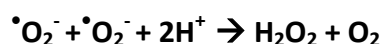


Figura 1. Rappresentazione schematica delle cause e degli effetti della sovrapproduzione dei ROS. Le frecce in nero rappresentano le possibili cause dello stress ossidativo, mentre con le frecce in rosso sono evidenziate le sue conseguenze.

Importanti radicali liberi, quali $\text{O}_2^{\bullet -}$ e il perossinitrito, ONOO^- , si formano nella cellula: il primo è generato dall'incompleta riduzione dell' O_2 , durante la respirazione aerobica, nella catena di trasporto degli elettroni mitocondriale o come prodotto di reazione di diversi sistemi enzimatici. Il secondo è formato dalla reazione tra $\text{O}_2^{\bullet -}$ ed NO, a sua volta prodotto ad opera dell'enzima NO-sintasi (NOS). Perossinitrito, NO ed altre specie che coinvolgono l'azoto sono classificate come specie reattive dell'azoto (RNS) [12, 13]. Inoltre, $\text{O}_2^{\bullet -}$ può facilmente reagire con i cluster ferro-zolfo nelle proteine [14] e funge da substrato dell'enzima superossido dismutasi (SOD) che lo dismuta a H_2O_2 ed O_2 (Reazione 1). Il H_2O_2 può generare a sua volta HO^{\bullet} mediante la reazione di Fenton, catalizzata dal ferro (Reazione 2).

Reazione 1



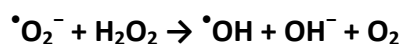
Reazione 2



La reazione di Fenton, in biologia cellulare è una parte della più complessa reazione di Haber-Weiss che catalizza la formazione di $\cdot\text{HO}^-$ a partire da H_2O_2 e dal ferro mantenuto nello stato di ossidazione ridotto da $\cdot\text{O}_2^-$ [15].

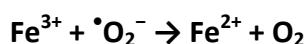
Complessivamente la reazione è la seguente (Reazione 3):

Reazione 3



Nello specifico, la prima parte del ciclo catalitico riguarda la riduzione del ferro (Reazione 3a), mentre la seconda parte riguarda, la reazione di Fenton indicata precedentemente (Reazione 2).

Reazione 3a



Il mantenimento dell'equilibrio tra ROS ed i sistemi di detossificazione è fondamentale per il mantenimento delle corrette funzioni dell'organismo aerobico [14]. Infatti, alcuni *pathway* di *signaling* sono redox-sensibili, cioè utilizzano i ROS per influenzare altri *pathway* responsabili di eventi come la crescita cellulare, il differenziamento, la proliferazione e l'apoptosi secondo un meccanismo di interazione noto come *crossstalk* [16]. Tra i principali *pathway* stimolati dai ROS rientrano: il fattore di trascrizione nucleare NF- κ B, il *pathway* del fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3K) /Akt, la proteina p53, le proteine *heat shock* e la cascata delle chinasi attivata da mitogeni (MAPK). Tra questi, i *pathway* che ricoprono maggiore rilievo nello stress ossidativo sono NF- κ B e MAPK [17]. Il fattore di trascrizione nucleare NF- κ B è generalmente presente nel citoplasma allo stato inattivato, coniugato con proteine inibitorie I κ B, e può essere attivato da una serie di stimoli tra cui H_2O_2 , citochine infiammatorie (IL-6, IL-1, TNF- α), lipopolisaccaride (LPS) ed altri agenti esterni. In seguito a tali stimoli, viene attivata una chinasi che fosforila I κ B (IKK) determinando il rilascio delle proteine p50 e p65 associate ad NF- κ B. Queste traslocano nel nucleo dove vanno a modulare l'espressione genica di diversi *target*, tra cui la SOD-2, iNOS, ciclossigenasi-2 (COX-2), particolari molecole di adesione endoteliale e varie citochine. Questi geni risultano essere coinvolti in numerosi processi biologici come la crescita cellulare, l'apoptosi, vari meccanismi infiammatori e patogenetici [16, 18, 19]. Pertanto, come indicato nella review di Morgan et

al. [20], sebbene molti geni regolati da NF- κ B svolgano un ruolo importante nella regolazione dei ROS nella cellula, gli stessi ROS fungono da inibitori o attivatori di vari *target* coinvolti nel *pathway* di NF- κ B. Per quanto riguarda MAPK, è in grado di attivare, per mezzo di varie chinasi, delle vie di *signaling* cellulare che coinvolgono la crescita, la trascrizione ed il rimodellamento. Tra gli stimoli principali che attivano MAPK rientrano il fattore di crescita, i ROS, le citochine infiammatorie e l'LPS. Nonostante NF- κ B e MAPK attivino vie di *signaling* differenti nella cellula, esistono tra le due notevoli sovrapposizioni funzionali [21, 22]. Inoltre, sebbene livelli fisiologici di ROS concorrano positivamente al biochimismo cellulare, livelli eccessivi di ROS (corrispondenti allo stress ossidativo) causano danni a proteine, lipidi e DNA, inducendo perossidazione lipidica, mutazioni genetiche, carcinogenesi nonché meccanismi di morte cellulare specifici come apoptosi, necrosi o autofagia [23, 24]. Inoltre, negli ultimi anni si sta consolidando l'esistenza di una stretta correlazione esistente tra stress ossidativo e numerose patologie infiammatorie, patologie ischemiche, disordini neurologici, patologie correlate all'invecchiamento e molte altre [25].

1.1.1 Sistemi di antiossidanti endogeni e loro meccanismi d'azione

I ROS possono essere detossificati da antiossidanti, cioè molecole abbastanza stabili che donano un elettrone ad un radicale, bloccandone la sua propagazione e riducendone la sua capacità di danneggiare molecole vitali. Alcuni di essi vengono prodotti durante il normale metabolismo cellulare, altri si ritrovano nella dieta [26, 27]. Uno dei due principali meccanismi d'azione di un antiossidante è il meccanismo di rottura della catena radicalica, attraverso cui l'antiossidante dona un elettrone al radicale libero presente nel sistema, impedendone la sua propagazione. Il secondo meccanismo d'azione riguarda la rimozione degli iniziatori di ROS/RNS attraverso il *quenching* (spegnimento) dell'iniziazione della catena radicalica. Gli antiossidanti possono agire anche mediante chelazione dei metalli di transizione, donazione di elettroni, utilizzo di co-antiossidanti o mediante regolazione dell'espressione genica [28]. Gli antiossidanti si distinguono in enzimatici e non enzimatici e si trovano sia in ambiente intracellulare che extracellulare per meglio contrastare l'azione dei ROS [26, 27]. Esempi di antiossidanti enzimatici sono: la SOD [29-31], la catalasi [32, 33] ed il sistema glutazione perossidasi/tranferasi/reduccasi [34-36]. Tra gli antiossidanti non

enzimatici rientrano: il glutatione [36-38], l'acido ascorbico [39, 40], la melatonina [41], i tocoferoli [42, 43], gli acidi urici [44, 45] e la bilirubina [46, 47].

In seguito ad insulto ossidativo, quindi, l'organismo mette in atto una serie di complessi sistemi antiossidanti che agiscono secondo differenti linee di difesa. La prima linea di difesa è costituita dagli antiossidanti preventivi, cioè quelli che agiscono sopprimendo la formazione dei ROS. La glutatione perossidasi, la glutatione S-transferasi ed il fosfolipide-idroperossido glutatione perossidasi (PHGPx) rappresentano degli enzimi che decompongono gli idroperossidi lipidici in alcoli. La glutatione perossidasi e la catalasi riducono inoltre il H₂O₂ in acqua. La seconda linea di difesa è rappresentata dagli antiossidanti che eliminano i ROS mediante soppressione della catena di iniziazione o blocco di quella di propagazione. Rientrano in questi antiossidanti quelli che agiscono da *scavenger* tra cui: la vitamina C, l'acido urico, la bilirubina, i tioli, la vitamina E e l'ubiquinolo. La terza linea di difesa è rappresentata dagli antiossidanti di riparo e *de novo* i quali riparano i danni cellulari indotti dai ROS e ne ricostruiscono le strutture danneggiate. Ne sono un esempio gli enzimi proteolitici, proteinasi, proteasi e peptidasi, presenti nel citoplasma e nei mitocondri delle cellule di mammifero. Rientrano in questa linea di difesa anche i sistemi di riparo del DNA effettuato da enzimi come le glicosidasi e le nucleasi. Una quarta linea di difesa è rappresentata dall'adattamento, in cui lo stesso segnale di produzione dei ROS e le reazioni indotte dagli stessi, innescano la produzione dell'antiossidante ed il trasporto dello stesso sul sito d'interesse [48].

1.1.2 Altre fonti antiossidanti

Nonostante il nostro organismo possieda importanti ed efficienti meccanismi di difesa dai ROS, negli ultimi anni è sempre più aumentato l'utilizzo di antiossidanti di derivazione vegetale sotto forma di integratori alimentari o di cibi funzionali. Tutto ciò accade parallelamente alla crescente consapevolezza che lo stress ossidativo rappresenta una causa rilevante di sempre più patologie. Inoltre, numerosi ricercatori hanno evidenziato come l'alimentazione gioca un ruolo cruciale per la salute e la prevenzione di patologie croniche [49-51]. Quasi profeticamente Stephen DeFelice aveva già coniato il termine "nutraceutico" definendolo un "alimento o parti di alimento che forniscono benefici per la salute umana e/o dal punto di vista medico, nella prevenzione e nel trattamento di

patologie" [52]. Alimenti interi come i broccoli, le carote o i pomodori sono esempi di cibo funzionale, il cui elevato contenuto rispettivamente di sulforafano, β -carotene e licopene è responsabile dell'azione antiossidante [53]. Studi recenti hanno messo in evidenza le importanti proprietà antiossidanti dimostrate da alcune specie di alghe verdi-azzurre. Alcune di queste sembrerebbero essere in grado di interferire con l'espressione di importanti *marker* dello stress ossidativo (GSH, SOD, LDH) prevenendo l'eccessivo danno muscolare indotto dall'esercizio fisico. Altre specie, sono in grado di ridurre la concentrazione di colesterolo, l'infiammazione mediata da ROS e/o la produzione di citochine infiammatorie [54, 55]. La diffusione crescente dei nutraceutici ed una maggiore assunzione di cibi funzionali ad elevato tenore di antiossidanti potrebbero essere un buon punto di partenza per contrastare i danni creati dallo stress ossidativo, prima che questi inneschino risposte patologiche irreversibili.

1.2 L'INFIAMMAZIONE

Con il termine infiammazione ci si riferisce ad una serie di complessi eventi fisiologici, immunologici o patologici che si innescano quando l'omeostasi di un organismo viene alterata da insulti chimici, fisici, microbici o di altra natura nociva [56]. Risulta essere pertanto una strategia di protezione di tipo immunitario, essenziale per garantire velocemente il ripristino delle corrette funzioni dell'organismo. L'infiammazione, nella sua fase acuta, è pertanto ampiamente considerata come parte dell'immunità innata: la prima linea di difesa dell'organismo ad insulti di vario genere che coinvolge sofisticati sistemi molecolari [56, 57]. L'infiammazione acuta si sviluppa di solito entro pochi minuti dallo stimolo nocivo, coinvolge il reclutamento di cellule dell'immunità innata (leucociti, macrofagi, linfociti, cellule dendritiche), cellule endoteliali, epiteliali e fibroblasti.

Il processo di infiammazione acuta può essere schematizzato in 3 fasi:

I. Innesco del meccanismo infiammatorio. Gli stimoli infiammatori sono inizialmente riconosciuti da un sistema di recettori specifici chiamati PRR, espressi sia dalle cellule del sistema immunitario innato che acquisito e coinvolti nel processo infiammatorio. Questi recettori riconoscono sia profili molecolari associati a patogeni esterni all'organismo che molecole associate a danni interni all'organismo e permettono di innescare i meccanismi più complessi del processo infiammatorio. In base alla loro funzione i PRR si distinguono in PRR endocitici o PRR di *signaling*. I primi, generalmente presenti sui fagociti, promuovono l'adesione, la fagocitosi e la distruzione dell'agente estraneo senza innescare una risposta infiammatoria intracellulare. I secondi includono una grande famiglia di recettori di membrana chiamati recettori *Toll-Like* (TLR) ed una famiglia di recettori citoplasmatici chiamati recettori *NOD-Like* [57-59]. I TLR sono caratterizzati nella parte citoplasmatica da un dominio TIR (ossia comune a TLR e IL-1). Nell'uomo sono stati identificati dieci TLR ognuno dei quali riconosce specifiche componenti microbiche. Il TLR-4, ad esempio riconosce in maniera specifica l'LPS, costituente principale della parete esterna dei Gram negativi. Invece gli eterodimeri formati da TLR-1/TLR-2 o TLR-2/TLR-6 riconoscono specificatamente i proteoglicani della parete dei Gram negativi oltre che altre costituenti di funghi, micobatteri e parassiti. Al contrario dei precedenti che si trovano sulle membrane extracellulari, i TLR-3, TLR-7, TLR-8 e TLR-9 sono recettori

presenti nelle membrane intracellulari, come sul reticolo endoplasmatico o sugli endosomi [57]. Il TLR-3 riconosce l'RNA a doppia elica tipico delle infezioni virali, mentre il TLR-9 quello del DNA batterico. Il TLR-5 è in grado di riconoscere in maniera specifica la flagellina batterica [60]. Il TLR-7 e TLR-8 sembrerebbero essere in grado di riconoscere l'imidazoquinolina (farmaco antivirale) [57], mentre ancora non sono chiare né la funzione né i ligandi di TLR-10 [61]. L'interazione di specifici stimoli infiammatori con questi recettori permette di innescare vari meccanismi di *signaling* cellulare che culminano nell'attivazione di geni nucleari responsabili di modifiche trascrizionali o post-trascrizionali. Prendendo a modello di molecola infiammatoria l'LPS, questa viene riconosciuta da un complesso sistema recettoriale prima di attivare il TLR-4. L'LPS è inizialmente riconosciuto da una proteina circolante specifica che lo lega chiamata LPS Binding Protein, proteina legante l'LPS che lo trasferisce al recettore dell'immunità innata CD14, il quale infine "presenta" LPS al TLR-4 (Figura 2-A). Il CD14 è presente sulla membrana dei fagociti, ma nella sua forma libera è capace di presentare LPS al TLR-4 in quelle cellule che non esprimono CD14 sulla membrana, come nel caso dell'endotelio vascolare, il quale presenta il recettore del TLR-4 ma non del CD14 [57]. Il TLR-4, una volta attivato, recluta proteine adattatrici, tra cui MyD88, responsabile a sua volta, dell'attivazione di particolari chinasi chiamate IRAK-1. Queste attivano TRAF-6, un adattatore che a sua volta attiva ulteriori chinasi. Queste sono responsabili dell'attivazione da un lato di NF- κ B, dall'altro di diverse chinasi da stress tra cui p38 o JNK (Figura 2-B).

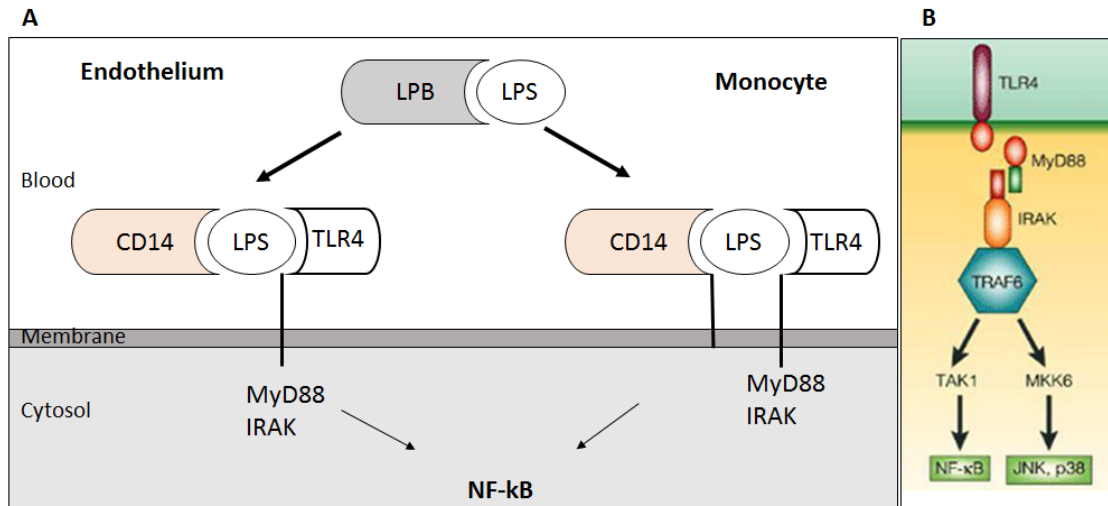


Figura 2. Attivazione del TLR-4 da parte del LPS e cascata di trasduzione del segnale. (A) Meccanismo di attivazione del TLR-4 in seguito a stimolo con LPS. Sia nell'endotelio che nei monociti il legame tra LPS e TLR-4 porta all'attivazione del fattore di trascrizione NF-κB, tuttavia il CD14 è presente solo sulla membrana dei fagociti, mentre nell'endotelio si ritrova nella sua forma libera. (B) Il TLR-4 una volta attivato, recluta proteine adattatrici responsabili dell'attivazione di particolari chinasi a loro volta responsabili dell'attivazione da un lato di NF-κB, dall'altro diverse chinasi da stress tra cui p38 o JNK.

(Opportunamente modificata da Pontieri et al. [57])

Della superfamiglia di proteine di NF-κB, quelle attivate in seguito ad un meccanismo infiammatorio sono p50 e p65, che in condizioni fisiologiche si trovano nel citoplasma sotto forma di precursori inattivati, legati alla proteina inibitoria IκB. Allo stato fisiologico, nel citoplasma sono anche presenti due proteina IKK1 e IKK2 mantenute allo stato inattivato dalla proteina NEMO. In seguito alle attivazione di varie chinasi da parte di TRAF-6, IKK1 e IKK2 sono fosforilate, ed a sua volta fosforilano IκB. Una volta fosforilata, IκB libera p50 e p65 e successivamente viene ubiquitinata a livello del proteosoma. Le proteine p50 e p65 di NF-κB migrano così nel nucleo, e modulano l'espressione genica di specifici *marker* infiammatori tra cui interleuchine, chemochine, molecole di adesione, enzimi che producono ulteriori molecole effettrici (iNOS, COX2), fattore di necrosi tissutale (TNF-α) e fattori di coagulazione [57, 62, 63] (Figura 3).

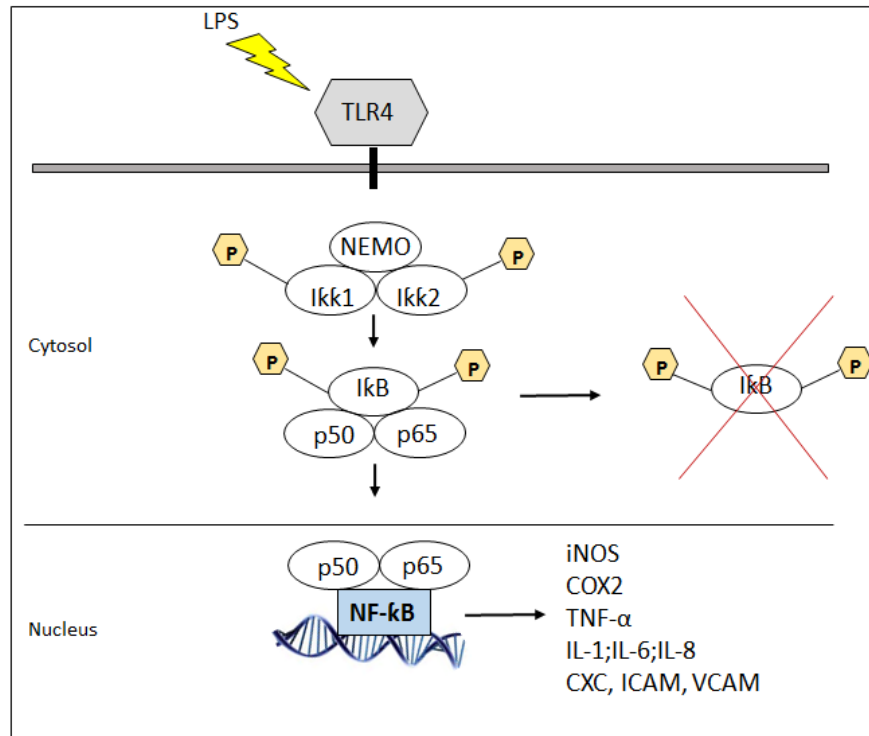


Figura 3. Cascata di segnalazione del TLR-4 attivata da LPS. In seguito all'attivazione di chinasi come TRAF-6 e IRAK-1 da parte dell'LPS, IKK1 e IKK2, mantenute allo stato inattivato da NEMO, vengono fosforilate e a loro volta fosforilano IκB, attivandolo. Una volta fosforilata, IκB, libera p50 e p65, mentre viene ubiquitinata a livello del proteosoma. Le proteine p50 e p65 di NF-κB migrano così nel nucleo, e modulano l'espressione genica di specifici *marker* infiammatori tra cui interleuchine, chemochine, molecole di adesione, enzimi che producono ulteriori molecole effettrici (iNOS, COX2), fattore di necrosi tissutale (TNF-α) e fattori di coagulazione.

II. Modificazioni vascolari e fenomeni cellulari. L'espressione dei mediatori dell'infiammazione sopra citati, innesca il richiamo nella regione lesa di cellule effettrici (monociti e neutrofili) che mediante un processo noto come degranulazione, creano un ambiente citotossico rilasciando sostanze chimiche nocive dai granuli citoplasmatici (ROS, RNS, proteasi). Tali sostanze danneggiano irreversibilmente l'agente patogeno e portano alla manifestazione dei segnali stereotipati dell'infiammazione locale: calore, gonfiore, arrossamento, dolore e perdita di funzione [64]. A livello vascolare intanto vi è una profonda alterazione del flusso ematico che si manifesta dapprima con una vasocostrizione transitoria seguita da una vasodilatazione del microcircolo arterioso, con conseguente aumento del flusso ematico. Contemporaneamente c'è un aumento della permeabilità vascolare con fuoriuscita di proteine e leucociti (in particolare monociti) dal microcircolo e

conseguente formazione di edema. La formazione dell'edema risulta essere strettamente correlata all'integrità endoteliale. L'endotelio infatti subisce una sorta di "retrazione" formando delle aperture, seppure con una cinetica ritardata rispetto a quella del rilascio degli stimoli infiammatori. In breve, quando un monocita circolante nel sangue raggiunge un sito di infiammazione, il flusso rallentato dato dalla vasodilatazione lo porta a rallentare fino ad avvicinarsi all'endotelio e rotolare su di esso (fenomeno di *rolling*). Ciò consente la sua interazione con l'endotelio per mezzo dell'interazione con particolari molecole adesive presenti su di esso quali le E- e P-selettine, molecole di adesione intracellulare (ICAM-1) e molecole di adesione vascolare (VCAM-1). Le E- e P- selettine fanno parte delle Leucocyte Endothelium Cell Adhesion Molecules, molecole di adesione tra leucociti ed endotelio, ma sono presenti solo nelle cellule endoteliali e riconosciute da monociti, linfociti e granulociti neutrofili. I monociti circolanti esprimono invece la L-selettina ed altre molecole adesive note come integrine (tra cui LFA-1 e MAC-1). Questa interazione tra molecole di adesione produce uno stato di attivazione del monocita la cui stabilità di legame all'endotelio aumenta. Ciò produce un'adesione stabile e l'inizio dell'*extravasazione* o *diapedesi* (passaggio del monocita dal lume del vaso al focolaio d'infiammazione). Il passaggio attraverso l'endotelio è facilitato dalla presenza sia sull'endotelio che sui monociti delle PECAM-1 (*Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1*). A questo segue il fenomeno della *chemiotassi* secondo cui i monociti migrano verso il sito d'infiammazione (Figura 4). Queste fasi sono sequenziali ed il blocco di uno di questi step, inibisce l'intero processo di reclutamento [57].

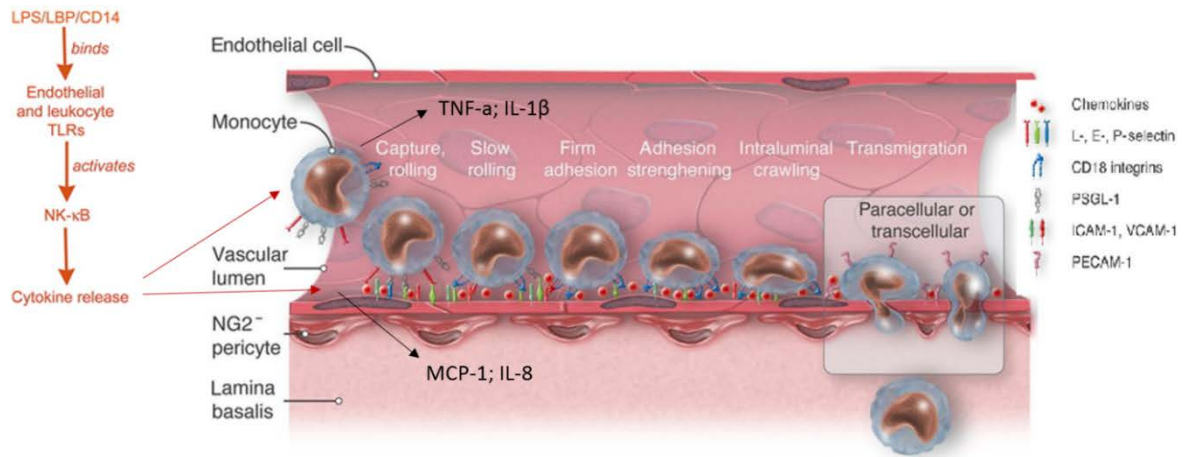


Figura 4. Fasi del reclutamento leucocitario e proprietà reologiche dell'endotelio in condizioni infiammatorie. In seguito ad infiammazione acuta le proprietà reologiche dell'endotelio cambiano, favorendo l'adesione dei leucociti (in particolare monociti). Ciò avviene mediante riconoscimento tra molecole adesive leucocitarie (integrine e selettine) e particolari recettori endoteliali (ICAM-1, VCAM-1). L'adesione, dapprima debole, successivamente ferma, innesca a sua volta il meccanismo di migrazione trans-endotheliale e conseguente chemiotassi. Ciò consente ai leucociti di raggiungere la regione d'infiammazione.

(Opportunamente modificata da Gerhardt et al. [65])

Raggiunto il sito di infiammazione i monociti mediante degranolazione innescano meccanismi citotossici come citato precedentemente, mentre quelli attivati in macrofagi promuovono il meccanismo di fagocitosi dell'agente patogeno.

III. Risoluzione dell'infiammazione. L'ultima fase dell'infiammazione acuta rappresenta la sua risoluzione, fondamentale per limitare i danni nell'organismo. Tale meccanismo entra in gioco poche ore dopo la fase iniziale dell'infiammazione ad opera delle stesse cellule coinvolte in precedenza, le quali, dopo la fase iniziale in cui producono prostaglandine pro-infiammatorie e leucotrieni, passano a produrre lipossine (in particolare lipossine A4 e B4), che bloccano un ulteriore reclutamento di neutrofili in sede, favorendo invece l'infiltrazione dei monociti importanti per la guarigione delle ferite [57, 66].

Qualora il processo infiammatorio non venga risolto, esso tende a cronicizzare trasformandosi in un infiammazione, definita appunto cronica, caratterizzata dalla coesistenza del meccanismo di infiammazione attiva, distruzione tissutale e continui tentativi di riparazione. Per questo motivo l'infiammazione cronica può protrarsi per

lunghi periodi (settimane o addirittura anni). L'infiammazione cronica può essere anche causata a seguito di infezioni persistenti da microorganismi difficili da eradicare, esposizione prolungata nel tempo ad agenti tossici o patologie autoimmuni. Nell'infiammazione cronica si verifica un accumulo di macrofagi che innescano la polarizzazione dell'infiammazione coinvolgendo il tessuto linfoide e l'immunità acquisita, il cui obiettivo è portare all'eradicazione dell'agente patogeno [57, 66]. L'infiammazione cronica è oggetto di studio continuo sia per la crescita di condizioni patologiche alla quale porta, sia per poterne meglio comprendere i meccanismi che ne sono alla base, ancora per la maggior parte irrisolti. Allo stato attuale le condizioni infiammatorie croniche sembrano essere coinvolte nella manifestazione di numerose patologie tra cui l'aterosclerosi, obesità, diabete di tipo 2, malattie neurodegenerative, malattie intestinali, miopatie, artrite reumatoide e cancro [67-69]. Sebbene generalmente l'infiammazione sia un evento locale, esso può avere anche conseguenze a livello sistemico. Si parla di infiammazione sistemica quando gli induttori della risposta infiammatoria attivano tutte le cellule monocitiche, macrofagiche ed endoteliali presenti in circolo. In tal senso, si parla di SIRS (*Systemic Inflammatory Response Syndrome*) riferendosi con tale termine ad una risposta infiammatoria sistemica anche se non necessariamente dipendente da agenti infettivi, mentre si parla di *sepsi* intendendo con essa una condizione infiammatoria sistemica i cui agenti responsabili possono essere identificati ed analizzati con tecniche *in vitro*. La manifestazione più grave in cui può evolvere la SIRS è lo shock settico dovuto alla sovrapproduzione di citochine che alterano il funzionamento di tutto l'organismo e può portare a disfunzioni d'organo che evolvono in insufficienze multiorgano [57, 70, 71].

1.2.1 Le malattie infiammatorie

Per malattie infiammatorie ci si riferisce ad un gruppo di disturbi clinici patologici caratterizzati da un processo infiammatorio anormale, come l'infiammazione cronica. Tuttavia l'infiammazione cronica e la patogenesi della malattia sono così strettamente connesse tra di loro che diventa difficile individuare chi delle due sia la causa e chi l'effetto. Ne costituiscono un esempio le miopatie, il diabete, l'artrite reumatoide, l'aterosclerosi, le patologie infiammatorie intestinali e molte malattie neurodegenerative

[67-69, 72, 73]. Il meccanismo della risposta infiammatoria in alcune di queste patologie è molto più complesso rispetto ad altre e molti meccanismi rimangono ancora da chiarire. Nell'ultimo decennio sembrerebbe essere sempre più evidente in ruolo chiave che l'infiammazione svolge nella patogenesi del cancro, in particolare nel processo di formazione del tumore. Grivennikov et al. [74], hanno dimostrato che il microambiente infiammatorio promuove la crescita delle cellule cancerose e aumenta anche il numero di mutazioni mediante la produzione di ROS ed RNS che causano danno al DNA e instabilità genomica. Il danno al DNA, così come alcune condizioni di stress sembrerebbero dunque essere strettamente correlati al fenomeno infiammatorio [75, 76].

1.2.2 Ruolo dei microRNA nell'infiammazione

I microRNA (miRNA), sono piccoli frammenti di RNA non codificante (19-25 nucleotidi), capaci di interferire con l'espressione genica a livello post-trascrizionale. I miRNA si legano al regione 3' UTR del mRNA e possono causare la degradazione del messaggero o il blocco della traduzione in proteina a seconda che sia totalmente o parzialmente complementare all'mRNA [77]. Negli ultimi anni è stata messa in evidenza la correlazione esistente tra miRNA e la modulazione di molecole dell'immunità innata [78], nonché il loro ruolo fisiologico e patologico. In tal senso, le alterazioni nell'espressione dei miRNA possono essere riconducibili a patologie renali [79], neuropsichiatriche [80], diabete [81] e cancro [82, 83]. Inoltre una serie di miRNA sono coinvolti nell'infiammazione e nello stress ossidativo indotto nelle cellule vascolari e giocano un ruolo chiave nella regolazione endoteliale e nella funzione dei vasi [84, 85]. Kuehbacher et al. [86], dimostrano come la soppressione dell'espressione di alcuni miRNA sia in grado di inibire la proliferazione e la formazione dei vasi in sistemi *in vitro*. Inoltre, vari studi hanno evidenziato come il *signaling* attivato dai TLR oltre ad indurre l'espressione di numerosi messaggeri dell'infiammazione modula anche quella di particolari miRNA, tra cui il miR-146a, uno dei primi ad essere stato identificato [87-89]. Sebbene il meccanismo con cui esso agisce nel contesto infiammatorio è ancora in fase di studio, è stato dimostrato che il miR-146a è in grado di interferire con il *pathway* di TLR-4 attraverso l'inibizione dell'espressione degli mRNA che codificano per IRAK-1 e TRAF-6. D'altro canto, è stato visto come la sua espressione aumenti in seguito a infezioni virali e meccanismi infiammatori. Inoltre,

questo microRNA sembra essere coinvolto in un meccanismo di regolazione a *feedback* negativo nella risposta anti-infiammatoria [88, 90-92]. In breve, in seguito ad attivazione di NF- κ B l'espressione di miR-146a risulta essere incrementata e, compatibilmente con un effetto anti-infiammatorio adattativo, esso può retroregolare a monte il processo infiammatorio inibendo IRAK-1 e TRAF-6, prevenendo l'ulteriore esacerbazione della risposta flogistica (Figura 5).

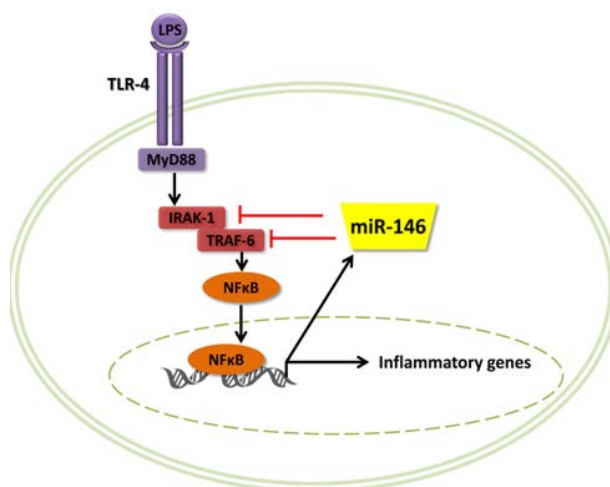


Figura 5. *Espressione e funzione di miR-146a.* In seguito all'attivazione del TLR-4, si innesca una cascata di eventi molecolari che attivano il fattore di trascrizione nucleare NF- κ B. L'attivazione di NF- κ B, porta alla trascrizione di vari geni tra cui il miR-146a, la cui espressione risulterà incrementata a seguito di uno stimolo infiammatorio. Tuttavia una volta traslocato nel citoplasma esso può anche contribuire ad attenuare la segnalazione innescata dal TLR-4 mediante l'inibizione di IRAK-1 e TRAF-6, secondo un meccanismo d'azione anti-infiammatorio.

(Opportunamente modificata da Jayadev et al. [93]).

Un altro miRNA che gioca un ruolo chiave nel processo infiammatorio è il miR-126, un miRNA endotelio-specifico, la cui sovra-espressione inibisce l'espressione di ICAM-1 e VCAM-1, interferendo nel legame dei monociti sull'endotelio (Figura 6) e salvaguardando l'integrità dell'endotelio vascolare [94, 95].

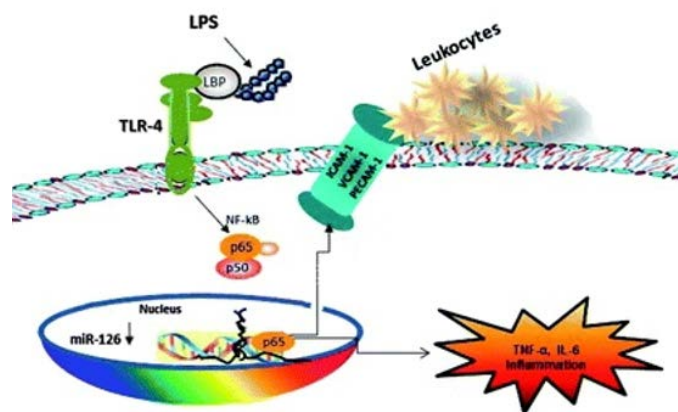


Figura 6. Espressione di miR-126 e dei suoi target ICAM-1 e VCAM-1 e loro funzione. L'attivazione del TLR-4 da LPS induce una diminuzione dell'espressione del miR-126. Ciò è responsabile di sovra-espressione delle proteine ICAM-1 e VCAM-1 responsabili dell'adesione endoteliale dei monociti durante il meccanismo infiammatorio.

(Opportunamente modificata da Angel-Morales et al. [96])

La rilevanza di questi due miRNA nella risposta infiammatoria attivata da TLR-4 è così consolidata che alcuni studi hanno utilizzato la loro espressione come *marker in vitro* dell'attività di sostanze di cui si testava l'azione anti-infiammatoria. Angel-Morales et al. [96] ad esempio, hanno evidenziato come i curcuminoidi promuovano sia l'inibizione di NF-κB che la riduzione dell'espressione di miR-146a in cellule endoteliali trattate con LPS. Più recentemente Fraternali et al. [97] hanno dimostrato come un estratto di vite sia in grado di incrementare l'espressione di miR-126 e conseguentemente ridurre l'espressione di ICAM-1 e VCAM-1 in cellule endoteliali.

1.3 IL MUSCOLO SCHELETRICO

Il muscolo scheletrico rappresenta circa il 40-50% della massa totale del corpo ed è formato da diverse cellule che cooperano tra di loro: cellule endoteliali, epiteliali, muscolari, nervose, mesenchimali, ematopoietiche e miogeniche [98-100]. Nel muscolo, le *fibre muscolari* sono disposte allineate in strutture che prendono il nome di *fascicoli* e sono avvolte in tessuto connettivo. Ogni fibra muscolare presenta alla periferia molti nuclei derivati dai mioblasti che, maturando, formano la fibra e da *cellule satellite* che giocano un ruolo chiave nel processo di rigenerazione muscolare. Ogni fibra è formata da un certo numero di *miofibrille* la cui unità funzionale è rappresentata dal *sarcomero* (Figura 7-A) [101]. Il sarcomero, strutturato a bande chiare e scure, è l'unità contrattile del muscolo scheletrico e comprende la regione di ogni miofibrilla delimitata tra due *linee Z*. All'interno di ogni sarcomero la *banda I* è formata da filamenti sottili di actina mentre la *banda A* è formata da filamenti spessi di miosina (Figura 7-B). Nell'area di sovrapposizione di filamenti sottili su quelli spessi si sviluppa la forza di contrazione. Il sarcomero è pertanto il responsabile della contrazione o del rilassamento del muscolo scheletrico [101].

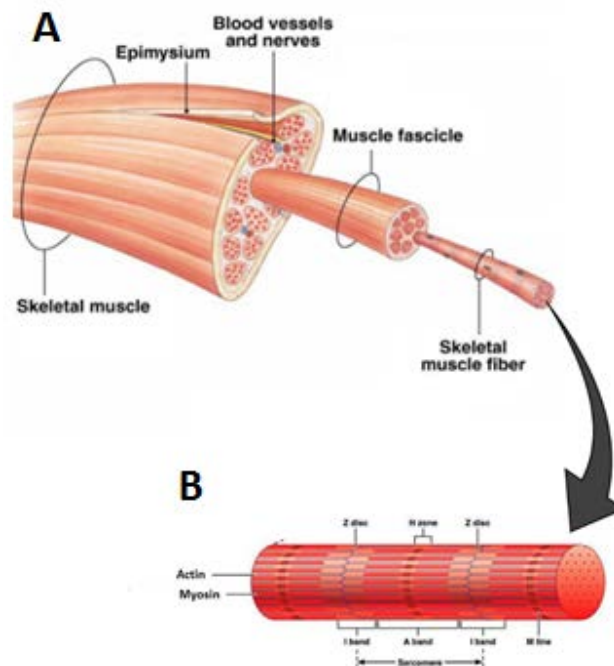


Figura 7. Rappresentazione schematica della composizione del muscolo scheletrico. (A) Il muscolo scheletrico è formato da fascicoli, a loro volta formati dalla fusione di fibre muscolari. Ogni fibra muscolare è costituita da miofibrille, la cui unità contrattile e funzionale è rappresentata dal sarcomero (B). Esso è

delimitato da due linee Z ed è costituito da filamenti spessi (miosina) e sottili (actina) che scorrendo gli uni sugli altri e spostandosi verso il centro del sarcomero ne determinano un suo accorciamento (contrazione).

(Opportunamente modificata da <http://www.rtmsd.org/page/1790>)

Oltre ad actina e miosina, esistono anche tutta una serie di proteine accessorie, tra cui la troponina e la tropomiosina, coinvolte nel processo di contrazione [102]. Il fenomeno contrattile è schematicamente descritto in figura 8 [101].

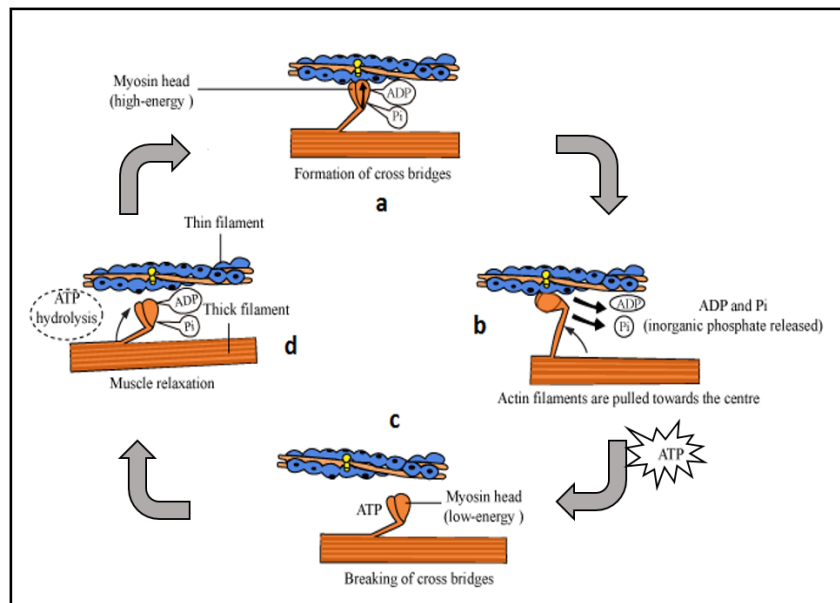


Figura 8. *Processo di contrazione nel muscolo scheletrico.* La contrazione muscolare è un fenomeno che ha inizio in seguito all'insorgenza del potenziale d'azione nella giunzione placca motrice. In seguito all'aumento di [Ca²⁺] la miosina si lega all'actina mediante la formazione di legami trasversali ad alta affinità (a). A ciò segue un cambiamento della conformazione della testa della miosina che spinge i filamenti di actina verso il centro del sarcomero, liberando ADP e P_i (b). Il successivo legame dell'ATP alla testa della miosina, diminuisce l'affinità della miosina per l'actina, determinandone il distacco (c). Segue l'idrolisi dell'ATP in ADP e P_i ed il rilassamento muscolare, salvo un'ulteriore aumento di [Ca⁺⁺] che fa ripartire il ciclo.

(Opportunamente modificata da <http://www.rtmsd.org/page/1790>)

1.3.1 La miogenesi

Per miogenesi si intende lo sviluppo del tessuto muscolare a partire dalle cellule progenitrici. Le cellule satellite, localizzate al di sotto della lamina basale [103], rappresentano la linea miogenica per eccellenza e sono coinvolte nella rigenerazione muscolare innescata da un insulto meccanico, chimico o degenerativo. In condizioni

normali queste cellule sono quiescenti ma, in seguito a stimoli sopracitati, si attivano ed iniziano a proliferare passando da mioblasti, a miociti ed infine, attraverso il processo di differenziamento in miotubi, partecipando al processo di rigenerazione muscolare, formando la nuova fibra [104, 105]. Il differenziamento muscolare è regolato da fattori di regolazione miogenica (MRF) tra cui MyoD, Myf-5, MRF-4 e miogenina. I MRF sono delle proteine elica-*loop*-elica che attraverso interazioni con specifiche regioni del DNA, attivano la trascrizione genica [106]. Tra i geni muscolo-specifici regolati dai MRF rientrano quelli per le catene pesanti della miosina (MyHC), l'actina o la creatina chinasi [107]. In particolare, MyoD e Myf-5 sembrerebbero essere dei regolatori precoci coinvolti nella proliferazione dei mioblasti e nell'attivazione delle cellule satellite durante la rigenerazione muscolare, mentre fattori come la miogenina o MRF-4 sembrerebbero essere attivi tardivamente e maggiormente coinvolti nel processo del differenziamento muscolare [108]. Quest'ultimo risulta essere un processo piuttosto complesso al quale contribuiscono anche altri co-fattori tra cui IGF-1 [109] ed altre proteine, come indicato da Kislinger et al. [110] (Figura 9).

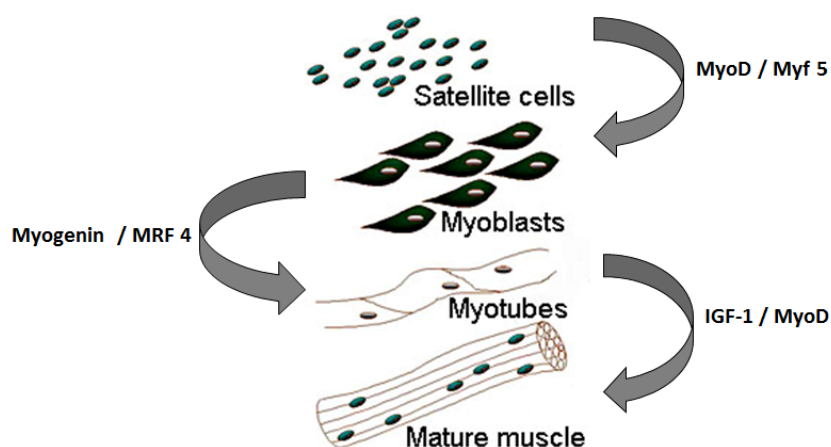


Figura 9. *Rappresentazione della miogenesi.* I primi fattori ad essere coinvolti nel processo della miogenesi sono MyoD e Myf5 che indirizzano le cellule verso la linea miogenica, nella formazione dei mioblasti. Successivamente fattori tardivi come MRF-4 promuove il differenziamento dei mioblasti in miotubi maturi, multi nucleati. MyoD e IGF-1 promuovono l'ipertrofia muscolare attivando modulatori di trascrizione muscolo specifici ed incrementando il contenuto di proteine. Ciò complessivamente porta alla formazione del muscolo maturo.

(Opportunamente modificato da <http://neuromuscular.wustl.edu/mother/myogenesis.html>)

I MFR ed IGF-1 sono coinvolti oltre che nel differenziamento muscolare anche nella risposta ipertrofica del muscolo scheletrico, intervenendo nella sintesi proteica e nell'inclusione dei micronuclei dei mioblasti nella fibra muscolare neo sintetizzata [104, 106, 111-113]. La corretta attivazione delle cellule satellite ed il corretto differenziamento dei mioblasti in miotubi sono alla base della rigenerazione muscolare e del mantenimento delle funzioni fisiologiche del muscolo scheletrico *in toto* [114].

1.3.2 Stress ossidativo e infiammazione: impatto sul muscolo scheletrico

Lo stress ossidativo è in grado direttamente o indirettamente di interferire con la capacità proliferativa delle cellule satellite e con quella differenziativa dei mioblasti, alterando così la struttura del muscolo scheletrico e interferendo con i fenomeni di rigenerazione [115]. Elevati livelli di ROS possono causare la perdita di miofibre mature [116]. I ROS sono normalmente prodotti durante la respirazione cellulare e la loro produzione risulta aumentata in condizioni fisiologiche durante l'esercizio fisico. Il primo studio sulla produzione di ROS indotta dall'esercizio fisico risale al 1978 [117]. Davies et al. [118] sono stati i primi a dimostrare che l'esercizio fisico innesca una produzione di radicali principalmente a livello dei muscoli scheletrici e del fegato. Da qui in poi vari studi hanno dimostrato uno stretto collegamento tra esercizio fisico e perossidazione lipidica, ossidazione proteica e danno al DNA [119-121]. Nel muscolo i ROS endogeni raggiungono livelli significativi nel corso dell'esercizio fisico [122]: tuttavia sembra che il loro ruolo in queste condizioni sia più spesso fisiologico che patologico. Quando l'esercizio fisico produce danno muscolare, il danno muscolare diventa causa di infiammazione la quale dovrebbe di per sé promuovere una cascata di eventi finalizzata alla rigenerazione della regione lesa. Tuttavia l'infiammazione può a volte assumere un significato contraddittorio, analogamente a quanto avviene in altri tessuti, diventando da fenomeno fisiologico con finalità riparative e difensive, un fenomeno fondamentale nella patogenesi di innumerevoli condizioni [123]. Infatti, nei casi in cui l'infiammazione persiste, vengono prodotti livelli sostenuti ed elevati di mediatori flogogeni, di sostanze citotossiche come i ROS e reclutate quantità crescenti di cellule competenti quali i macrofagi, che possono esacerbare la sofferenza e il danno nel tessuto. Nel caso specifico del muscolo scheletrico,

questi fenomeni, in particolare l'elevato livello di ROS, possono anche alterare la capacità dei mioblasti e delle cellule satellite di compiere il loro percorso differenziativo a miotubi maturi [124], creando uno sbilanciamento dell'equilibrio rigenerativo.

È infatti associato che lo stress ossidativo e l'infiammazione cronica sono concause in varie patologie muscolari multifattoriali caratterizzate da un'alterazione tra proliferazione e differenziamento cellulare. Esempi di tali patologie sono la distrofia di Duchenne [125], la sarcopenia [126] e la cachessia [116].

L'attivazione del *pathway* infiammatorio di TLR-4 è in grado di ridurre la sintesi proteica in un sistema *in vitro* di mioblasti murini (C2C12) [127]. Uno studio recente ha esteso questa osservazione evidenziando come l'LPS *via* TLR-4, induca, nel muscolo di suini neonati, uno stato infiammatorio in grado di inibire la sintesi proteica e causare atrofia muscolare [128]. Quindi l'LPS, sebbene anche altri e più complessi fattori entrano in gioco nella patogenesi atrofica [129], innesca una serie di risposte infiammatorie mediate da TLR-4 che culminano nella produzione di citochine coinvolte nel catabolismo muscolare [130, 131].

Anche specifici miRNA (chiamati miomiRNA) sono coinvolti nello sviluppo del muscolo scheletrico, nella sua proliferazione nonché in alcune manifestazioni patologiche muscolari tra cui l'atrofia muscolare [132-137]. A questo proposito è interessante sottolineare che l'attivazione del TLR-4 altera i profili di espressione di miRNA come il miR-146a, miR-155, miR-132, miR-15a/16, miR-27a e miR-532-5p [88, 138-141]. Complessivamente, nonostante la ricerca nel settore sia molto recente, si concorda sul coinvolgimento dei miRNA nell'atrofia muscolare indotta da LPS.

1.4 I CIANOBATTERI

I cianobatteri sono organismi procarioti e fotoautotrofi che vivono in ambienti acquatici di vario tipo ed il loro nome deriva dal colore blu che spesso li caratterizza. Essi appartengono al *phylum* dei batteri fotosintetici e vengono indicati, anche se impropriamente, con il nome di alghe azzurre, microalghe, alghe verdi-azzurre o Cianofitee [142]. I cianobatteri sono organismi unicellulari costituiti da una parete di tipo Gram negativo e possono vivere a gruppi di piccole colonie o come singole cellule, come organismi galleggianti o ancorati ad un substrato solido. L'analisi di stromatoliti contenenti tracce di cianobatteri ha fatto risalire la loro origine a diversi miliardi di anni fa [143, 144], facendone la specie vivente più antica del pianeta. La grande varietà di cianobatteri e la loro capacità di adattarsi con frequenti alterazioni morfologiche alle variazioni ambientali, ha reso particolarmente complicata la loro classificazione. Esistono numerose classificazioni dei cianobatteri, ideate in base a numerose variabili acquisite o perse nel corso dell'evoluzione come ad esempio le dimensioni, la polarità, la presenza o meno di particolari strutture, la forma, il tipo di ramificazioni e altre caratteristiche morfofunzionali [145-147]. Rippka et al. [148] e Castenholz et al. [149], avevano proposto una divisione in 5 sezioni che venne accettata come base per la stesura del Manuale di Batteriologia Sistemica di Bergey (*Chroococcales*, *Pleurocapsales*, *Oscillatoriales*, *Nostocales*, *Stigonematales*). Più recentemente Komarek et al. [150], hanno riportato un innovativo sistema di classificazione tassonomica che tiene conto non solo delle caratteristiche molecolari o morfologiche dei diversi cianobatteri ma anche della loro storia evolutiva. Secondo tali autori, ad oggi i cianobatteri appartengono al *phylum* chiamato Cyanophyta che è costituito dalla classe delle Cyanophyceae a sua volta distinta in 8 ordini:

- Gloeobacterales;
- Shynecococcales;
- Spirulinales;
- Chroococcales;
- Pleurocapsales;
- Oscillatoriales;

- Chroococciopsidales;
- Nostocales.

Tali ordini risultano ulteriormente distinti in generi e specie differenti. Alcune specie sono in grado di formare delle “fioriture” sulla superficie acquatica di appartenenza che rilasciano nell’acqua, come meccanismo di difesa, potenti epatotossine e neurotossine, responsabili della morte degli altri organismi acquatici presenti e degli animali che utilizzano queste fonti d’acqua [151]. Altri cianobatteri sembrerebbero essere in grado di produrre particolari metaboliti ad attività chemioterapica (antibiotici o anticancerogeni) [152]. Una particolare specie di *Lyngbya majuscula* è in grado di produrre una molecola che presenta attività cancerogena o anti-neoplastica a seconda che contenga o meno Br [153]. Proprio la scoperta dell’esistenza di metaboliti farmacologicamente attivi sta portando ad approfondire particolari caratteristiche, prodotti di reazione o molecole presenti nei cianobatteri. Negli ultimi anni si sta assistendo infatti ad un incrementato utilizzo degli stessi nell’alimentazione umana o animale, nella cosmesi ed in diversi settori industriali [154].

1.4.1 Caratteristiche cellulari e strutturali dei cianobatteri

I cianobatteri presentano una struttura tipica dei Gram negativi, nonostante condividano alcune caratteristiche anche con i Gram positivi. La cellula cianobatterica presenta un rivestimento definito *envelope* formato dall’aggregazione di 4 strati: una membrana cellulare, uno strato di peptidoglicano (mureina) spesso quanto quello dei Gram positivi, uno strato periplasmatico intermedio ed una membrana esterna che differisce dalla struttura tipica dei Gram negativi in quanto formata da lipopolisaccaridi, carotenoidi, acidi grassi e porine ancorate allo strato di peptidoglicano [155]. In alcune specie può anche essere presente un ulteriore strato oltre alla membrana esterna definito glicocalice. In qualità di procarioti, i cianobatteri non presentano un nucleo cellulare ben definito, ma un nucleoplasma contenente il DNA. Sparsi nel citoplasma i ribosomi 70S, i carbossisomi, contenenti anidrasi carbonica e ribulosio-1,5-bifosfatocarbossilasi-ossigenasi (enzima deputato alla fissazione della CO₂), granuli di cianoficina (che funge da riserva di azoto), “amido delle cianoficee” (polisaccaride glicogeno-simile) e goccioline lipidiche (Figura 10-

A). Non disponendo di cloroplasti, essi svolgono la fotosintesi in particolari ripiegature della membrana che prendono il nome di tilacoidi, strutture deputate anche alla funzione respiratoria [156-158]. I cianobatteri sono in grado di produrre ossigeno utilizzando l'acqua come donatore di elettroni e pertanto sono considerati i responsabili dell'evoluzione del metabolismo aerobico sulla Terra. Inoltre, essendo in grado di ridurre l'azoto e l'anidride carbonica in condizioni aerobiche svolgono numerose funzioni ecologiche vitali globali [159, 160]. Per effettuare la fotosintesi, i cianobatteri, utilizzano oltre alla clorofilla-a, anche altri pigmenti fotosintetici tra cui il β -carotene, la zeaxantina ed in particolare le ficobiline, strutture cromofore tetrapirroliche a catena aperta coniugate a proteine (Figura 10-D), che permettono di sfruttare una porzione molto più ampia dello spettro visibile, aumentando l'efficienza del processo fotosintetico e permettendo ai cianobatteri di sopravvivere anche in condizioni di scarsa luminosità come nelle profondità marine [161]. Le ficobiline sono organizzate in strutture che prendono il nome di ficobilisomi (Figure 10-A e 10-B). Essi non sono altro che complessi molecolari costituiti da una porzione centrale detta *core* e da *antenne* periferiche in grado di catturare le radiazioni luminose trasferendo l'energia ai centri di reazione dei cianobatteri, cioè al Fotosistema I (PSI) ed al Fotosistema II (PSII) [162]. Sia il *core* che le *antenne* sono costituite da ficobiliproteine (PBP) ossia polipeptidi acidi solubili in acqua legati covalentemente alle ficobiline mediante legami tioetere (Figura 10-D). Oltre alle PBP, il ficobilisoma presenta anche dei polipeptidi basici non cromofori di natura idrofoba che prendono il nome di proteine *linker* la cui funzione principale è quella di unire due PBP consecutive [163]. Le PBP assorbono la luce visibile in un range che va dai 450 ai 670 nm ed in base all'assorbimento massimo (λ max) caratteristico della ficobilina che le compone se ne distinguono tre tipi principali:

- Ficoeritrina (PE): rosa brillante con λ max 540 – 570 nm
- Ficocianina (PC): blu cobalto con λ max 610 – 620 nm
- Alloficocianina (APC): azzurro con λ max 650 – 655 nm

Sia APC che PC sono costituite dalla ficobilina chiamata ficocianobilina, mentre PE è costituita dalla ficoeritrobilina (Figure 10-C e 10-D). Il *core* del ficobilisoma è generalmente costituito da APC, mentre le *antenne* da PC e PE dove la prima è sempre legata al *core* mentre la seconda, se presente, è disposta più esternamente (Figura 10-B)

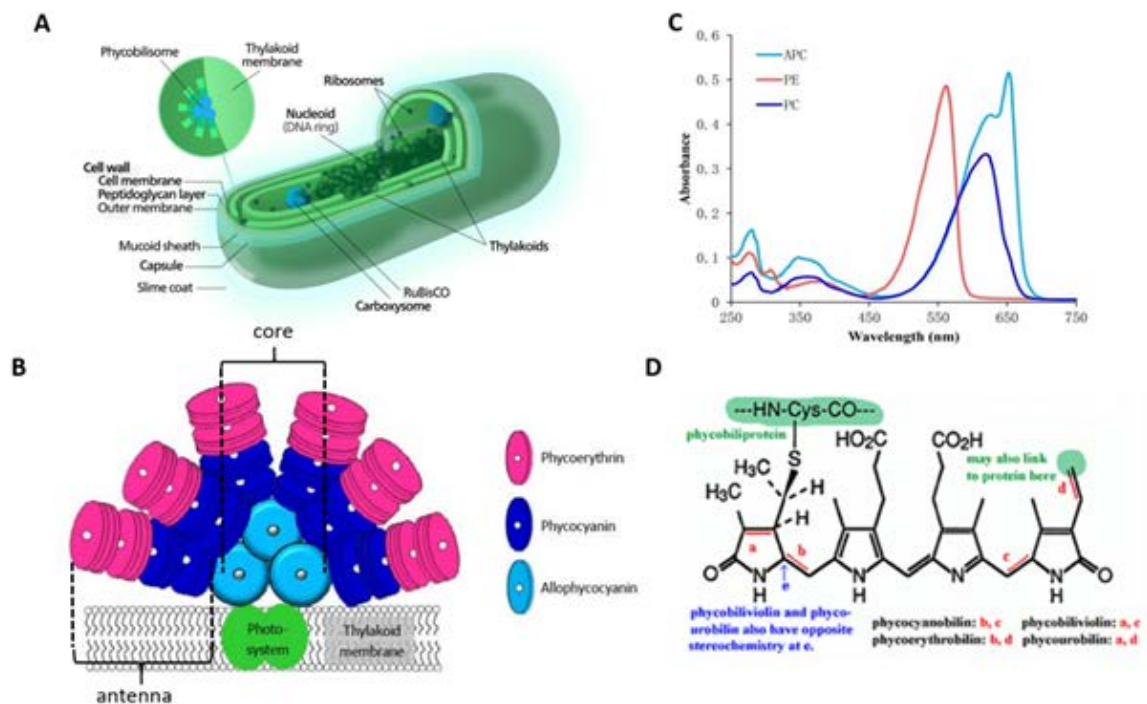


Figura 10. *Organizzazione dei ficobilisomi e delle PBP all'interno di un cianobatterio.* (A) La cellula di un cianobatterio, presenta ancorati alla membrana tilacoidale, i ficobilisomi che sono formati da un core e da pigmenti antenna (B) la cui funzione principale è quella di trasferire le radiazioni luminose al PSII. Le particolari PBP contenute nei ficobilisomi assumono una disposizione tale da favorire il passaggio dei raggi luminosi. (C) Il colore delle PBP è dato dalle diverse ficobiline da cui sono composte. (D) Le ficobiline sono strutture tetrapirrolliche a catena aperta e rappresentano il gruppo cromoforo delle PBP. Il diverso arrangiamento chimico dei gruppi funzionali presenti da luogo alle varie ficobiline esistenti, caratterizzate, fra l'altro, da una diversa fluorescenza. Le ficobiline sono legate covalentemente ad una struttura proteica più complessa a formare le PBP.

(Opportunamente modificato da Sing et al. [162], e da Grossman et al. [164])

Altre ficobiline presenti in alcune PBP dei cianobatteri sono la ficourobilina e la ficobiliviolina (o ficoviolobilina) che permettono di catturare la luce in particolari range dello spettro visibile (Figura 10-D) [161, 162, 164]. Ogni PBP è formata da due differenti subunità chiamate α e β aventi peso molecolare rispettivamente di 15 – 20 kDa e 17 – 22 kDa, aggregate in modo da formare un monomero ($\alpha\beta$), un trimero ($\alpha_3\beta_3$) o un esamero ($\alpha_3\beta_3$)₂. Ad ognuna delle singole subunità possono essere legate una o più ficobiline. Alcuni studi cristallografici ai raggi-X hanno evidenziato come ognuna delle subunità α e β , siano formate da sei alfa-eliche globino-simili. Ad esse si aggiungono due domini elicoidali

a gomito che permettono di stabilizzare il monomero ($\alpha\beta$). Tali subunità insieme alle ficobiline, mediante oligomerizzazione, formano strutture trimeriche o esameriche discoidali che sono alla base della struttura delle *antenne* e del *core*. La disposizione dei dischi di PBP all'interno del ficobilisoma non è casuale. Al contrario il diverso spettro di emissione ed assorbimento tra le PBP poste alle estremità delle *antenne* e quelle poste nel *core* assicurano un rapido flusso direzionale delle radiazioni luminose e quindi dell'energia dalle ficobiline che fungono da donatori a quelle che fungono da accettori. Anche la posizione dei polipeptidi *linker* contribuisce al rapido flusso direzionale dell'energia spostandola verso il *core* [162, 165]. Inoltre, anche la tipologia ed il numero di ficobiline legate ad una determinata PBP mediante residui cisteinici sono parametri, generalmente fissi, per poter permettere il corretto trasferimento energetico. Infatti, se le ficobiline sono libere o denaturate hanno una minore fluorescenza rispetto a quella che presentano nell'intero ficobilisoma. Ciò indica come l'energia di eccitazione dipenda dalla conformazione assunta dalla proteina in un determinato contesto. Tale energia tenderà a diminuire se la ficobilina si presenta in forma libera o assume una conformazione differente rispetto a quella presente nel ficobilisoma. È stato inoltre evidenziato come il numero dei doppi legami coniugati presenti in una ficobilina incidono sull'assorbimento di radiazioni luminose e quindi sulla λ max. Nelle PBP le ficobiline assumono una conformazione rigida che, riducendo la libertà delle molecole, aumenta la durata dello stato di eccitazione della proteina rendendo più efficiente lo stato di trasduzione del segnale luminoso. Per lo stesso motivo anche le interazioni tra α e β possono determinare importanti variazioni a livello spettroscopico. Ad esempio, come riportato da Singh et al. [162], quando $\alpha\beta$ è presente allo stato monomero nell'APC questa presenta una λ max di 615 nm, mentre se presente in forma trimerica presenta una λ max di 650 nm.

1.4.2 Associazione delle ficobiline nelle principali PBP

I cianobatteri presentano principalmente tre tipi di PBP: PE, PC e APC le cui ficobiline che le caratterizzano sono rispettivamente la ficoeritrobilina per la prima e la ficocianobilina per le ultime due. Tuttavia ogni PBP assume una sua conformazione strutturale caratteristica. La PE si presenta generalmente sia in forma trimerica ($\alpha_3\beta_3$) che esamerica

$(\alpha_3\beta_3)_2$, ma può anche formare strutture con altri complessi oligomerici legati al altri gruppi cromofori. Le subunità α e β legano generalmente due ficobiline ognuna. Nella struttura dell'intero ficobilisoma PE si trova generalmente a livello apicale delle *antenne*. La PC si trova in complessi trimerici $(\alpha_3\beta_3)$, esamerici $(\alpha_3\beta_3)_2$ o associata ad altre strutture oligomeriche leganti diversi cromofori. Un trimero di PC è formato dall'unione ad anello di tre monomeri $(\alpha\beta)$ legati insieme, mentre l'esamero assume una conformazione discoidale formata dalla interposizione faccia a faccia di due trimeri. Generalmente PC presenta un cromoforo legato alla subunità α e due alla subunità β . Nella struttura del ficobilisoma PC è localizzata nella parte interna delle *antenne*, prossimale al *core* [162]. Esistono diverse tipologie di PC a seconda del tipo di cromofori legati e del tipo di cianobatterio dal quale è estratta [164]. Per quanto riguarda l'APC, essa è presente in forma trimerica $(\alpha_3\beta_3)$ ed ognuna delle tre subunità α o β presenti lega una ficocianobilina. La sua caratteristica principale è quella di fungere da accettore delle radiazioni luminose assorbite dalla adiacente PC e dalla PE, se presente. Associate alla APC nel *core* sono presenti anche altre proteine legate a strutture cromofore, la cui funzione è quella di catturare ulteriore energia luminosa e raccogliere quella catturata da APC per trasferirla alla clorofilla-a presente sulla membrana tilacoidale [166, 167]. Esistono anche altre ficobiline come la ficourobilina e la ficobiliviolina che possono essere associate alla ficocianobilina oppure alla ficoeritrobilina per formare altre PBP (Tabella 1). Ne sono un esempio la Ficoeritrocianina (PEC) e la B-Ficoeritrina. La PEC è costituita sia da ficocianobilina che ficobiliviolina, mentre la B-Ficoeritrina, il cui prefisso indica che è stata isolata da alghe appartenenti alla divisione delle Bangiofitee, è costituita sia da ficoeritrobilina che da ficourobilina [162, 164].

Tabella 1. *Classificazione e struttura dei cromofori delle più comuni PBP.* (Opportunamente modificata da Singh et al. [162])

BILIPROTEINS	CHROMOPHORES	SUBUNIT	CHROMOPHORES ON A SUBUNIT
Phycoerithrin (da Cianobatteri)	Phycoeritrobilin	$(\alpha_3\beta_3)_2$	$\alpha = 2$ $\beta = 3 \text{ or } 4$
Phycocyanin (da Cianobatteri)	Phycocyanobilin	$(\alpha_3\beta_3)_2$	$\alpha = 1$ $\beta = 2$
Phycoerythrocyanin (PEC)	Phycobiliviolin/Phycocyanobilin	$(\alpha_3\beta_3)$	$\alpha = 1$ Phycobiliviolin $\beta = 2$ Phycocyanobilin
Allophycocyanin (APC)	Phycocyanobilin	$(\alpha_3\beta_3)$	$\alpha = 1$ $\beta = 2$
Phycoerythrin (da Bangioficee)	Phycoerythrobilin/Phycourobilin	$(\alpha_3\beta_3)_2\gamma$	$\alpha = 2$ Phycoerythrobilin $\beta = 4$ Phycoerythrobilin $\gamma = 2$ Phycoerythrobilin and 2 Phycourobilin

1.4.3 Cianobatteri e nutraceutica

I cianobatteri presentano numerose molecole bioattive tali da rendere alcune specie un ideale alimento funzionale per l'uomo e per gli animali. I cianobatteri e i loro bioattivi trovano anche impiego nell'industria cosmetica, nella produzione di pigmenti, additivi, biodiesel, pesticidi o biofertilizzanti [154, 168]. Il primo utilizzo dei cianobatteri come fonte di cibo risale a più di 2000 anni fa. Altre evidenze riportano l'utilizzo di particolari specie di cianobatteri non solo come alimento ma anche come medicinali etnici nel trattamento di vari stati patologici [168-170]. Il loro elevato contenuto in vitamine essenziali (vitamine A, B1, B2, B3, B9, B12 ed altre), insieme alla loro capacità di concentrare elementi essenziali (tra cui potassio, zinco, magnesio, cobalto, calcio, fosforo e azoto) nonché di produrre acidi grassi polinsaturi Omega-3 ed Omega-6, ha permesso di incrementare in modo esponenziale la loro produzione per far fronte alla richiesta sempre maggiore in ambito nutraceutico [171]. Negli ultimi anni si parla sempre più

frequentemente di “attività nutraceutica”, intesa come la capacità da parte degli alimenti, o parti di essi di esercitare una funzione benefica per la salute umana, incrementando lo stato di benessere e prevenendo così l’insorgenza di patologie croniche e/o l’invecchiamento cellulare [52]. I nutraceutici continuano a subire una forte crescita, [172]. Tra le particolari molecole bioattive, di crescente interesse nella nutraceutica rientrano i pigmenti fotosintetici presenti nei cianobatteri, ai quali numerosi studi hanno attribuito importanti attività biologiche tra cui l’attività antiossidante, anti-carcinogenica, anti-infiammatoria, anti-angiogenica e neuroprotettiva [173]. In particolare i pigmenti ai quali ci si riferisce sono i carotenoidi e le PBP [154, 174]. Le specie di cianobatteri maggiormente utilizzate in ambito nutraceutico sono: *Aphanizomenon flos-aquae*, *Spirulina platensis*, *Spirulina maxima*, *Spirulina fusiformis*, e *Nostoc commune var. sphaeroids Kützing* [54].

1.5 APHANIZOMENON FLOS-AQUAE COME SUPPLEMENTO NUTRIZIONALE

Aphanizomenon flos-aquae Ralfs Ex Born. & Flah. Var. *flos aquae* (AFA), comunemente nota come *Klamath* è una microalga edibile appartenente al *phylum* dei cianobatteri il cui uso come supplemento nutrizionale è fortemente aumentato negli ultimi anni. Tale utilizzo è giustificato dalla presenza di importanti nutrienti come gli acidi grassi essenziali, vitamine, amminoacidi, sali minerali, carboidrati complessi ed enzimi che svolgono innumerevoli funzioni biologiche all'interno dell'organismo. Ad oggi, AFA è fortemente commercializzata come *nutrient-dense food*, la cui fonte principale di raccolta è il lago Klamath (Oregon, USA) in cui fiorisce spontaneamente. In questo differisce significativamente dalla *Spirulina* (un altro cianobatterio utilizzato in nutraceutica) che, invece, viene coltivata in stagni artificiali [169]. AFA contiene grandi quantità di clorofilla-a (che costituisce circa il 2% del suo peso secco) alla quale è stata riconosciuta la capacità migliorare la funzionalità epatica [175]. Diversi studi riportano che la PC estratta da AFA (PCA) ha attività di *scavenger* di specie radicaliche dell'ossigeno tale da inibire l'emolisi ossidativa negli eritrociti umani [176, 177]. Per la sua composizione AFA è in grado di diminuire i livelli di colesterolo e di trigliceridi [178, 179]. Inoltre, essendo ricca in Omega-3 ed Omega-6, AFA agisce positivamente sulle patologie causate o esacerbate dalla carenza di questi polinsaturi, come stati di immunosoppressione [180], malattie cardiovascolari [181] e disturbi della sfera cognitiva ed affettiva [182]. Altre componenti di AFA hanno dimostrato varie attività: chemiopreventiva, attivando le cellule natural killer e inducendo la morte programmata in cellule tumorali [183]; antibatterica [184] e di antiadesività piastrinica [185]. Pung et al. [186] hanno evidenziato come i polisaccaridi di cui è composta AFA abbiano un'attività immunomodulante maggiore delle preparazioni utilizzate in clinica per l'immunoterapia contro il cancro. Non di minore importanza un recente lavoro di Scoglio et al. [187], che dimostra come AFA sia ricca in fenietilamina, un importante neurotrasmettitore endogeno ad azione neuromodulatoria, metabolizzato rapidamente ad opera di enzimi inibitori delle monoamino ossidasi. Le PBP contenute in AFA e altri composti in essa presenti, come gli aminoacidi micosporino-simili, sembrerebbero avere un'attività sinergica nell'inibire le monoamino ossidasi-B. Ciò è particolarmente rilevante nella clinica dei disturbi dell'umore e di malattie neurodegenerative. Inoltre, sempre gli stessi autori hanno dimostrato che la ficobilina

contenuta in AFA, la ficocianobilina, è in grado di inibire, in cellule tumorali della prostata e della tiroide, l'attività dell'UDP-deidrogenasi, un enzima coinvolto nella progressione tumorale [188]. Tuttavia, sono stati approfonditi anche eventuali rischi per la salute umana. È noto come alcune specie del genere *Aphanizomenon*, così come anche alcune del genere *Anabena* o *Microcystis*, siano in grado di produrre cianotossine, in particolare neurotossine (anatotossine e saxitossine) ed epatotossine (microcistine). Poiché AFA può crescere vicino ad altri cianobatteri produttori di cianotossine, queste potrebbero essere inconsapevolmente raccolte e contaminare la materia prima. Per scongiurare questo rischio, vengono effettuati numerosi controlli sia durante la raccolta, che in fase di lavorazione del prodotto per garantirne la massima sicurezza nell'utilizzo [151, 152, 169, 171]. Schaeffer et al. [189], hanno dimostrato che la supplementazione di giovani topi adulti con 333 µg/kg peso corporeo/al giorno di microcistine non ha avuto alcun effetto avverso né sulla crescita e/o sulla sopravvivenza dei soggetti trattati né sulla riproduzione e/o sulle caratteristiche morfologiche degli organi interni degli stessi. Pertanto il valore di NOAEL (dose senza effetto avverso osservabile) può essere accettato in 333 µg/kg peso corporeo/al giorno di microcistine. All'innocuità concorrono probabilmente anche le modalità di somministrazione che simulano l'apporto dietetico: infatti, attraverso la dieta, la somministrazione è graduale nel tempo e, in caso di contaminazione da microcistine delle microalghe, intervengono efficacemente i sistemi di detossificazione corporei. Per ulteriore e maggiore precauzione, il limite massimo di microcistine ammesse è stato comunque fissato in di 1 µg per gr di AFA, ovvero una riduzione di un fattore > 300 rispetto alla NOAEL di 333 µg/kg/die: è quindi possibile affermare la sicurezza d'utilizzo di AFA.

1.5.1 Caratteristiche strutturali di AFA

AFA condivide con la *Spirulina*, anch'essa edibile, la caratteristica di essere un cianobatterio con un alto contenuto in PC, ma differisce da questa e dalla *Chlorella*, un'alga verde unicellulare utilizzata in nutraceutica, per la sua capacità di crescere spontaneamente [169, 171]. Inoltre, presenta caratteristiche strutturali che la rendono unica nel suo genere. Le PBP che costituiscono i ficobilisomi di una cellula intera di AFA, si

trovano generalmente sotto forma di esameri $(\alpha_3\beta_3)_2$. Da analisi elettroforetiche è stato evidenziato come in seguito a rottura della cellula che avviene durante la fase di estrazione delle componenti attive, le PBP si trovano in forma trimerica $(\alpha_3\beta_3)$ con un peso molecolare di circa 121 kDa [190]. Gli studi condotti sulla struttura delle PBP presenti nella *Spirulina* hanno invece evidenziato come, in seguito a rottura cellulare, esse si presentino in forma monomerica $(\alpha\beta)$. Altre differenze sono emerse da studi cromatografici dei ficobilisomi di AFA, secondo cui il *core* non contiene APC, ma PEC, una particolare PBP, presente limitatamente nei cianobatteri e costituita non solo dalla ficocianobilina ma anche dalla ficobiliviolina [162, 164, 190]. Come riportato in *Tabella 1*, ogni monomero di PEC lega due ficocianobiline in β e una ficobiliviolina in α , invece PC lega per ogni monomero 3 ficocianobiline (due in β e una in α). PEC, analogamente a quanto accade nel *core* di cianobatteri costituiti da APC, sembrerebbe essere presente in forma trimerica $(\alpha_3\beta_3)$. Il ficobilisoma di AFA risulta essere così qualitativamente differente a quello di altri cianobatteri [162, 190]. Il legame tra PC e PEC in AFA sembrerebbe essere così forte da essere stabile anche attraverso i comuni metodi di purificazione utilizzati. Pertanto in estratti di AFA contenenti PCA è da considerare la presenza di PEC, sebbene apparentemente non rilevabile. Infatti, PEC presenta una λ max di 566 nm se si considera come cromoforo la ficobiliviolina legata alla subunità α , una λ max di 593 e 639 nm se si considera la ficocianobilina presente rispettivamente nelle due subunità β , rispetto alla λ max di 620 nm della ficocianobilina presente in PC [190]. Ciò se da un lato conferma quanto precedentemente riportato da Singh et al. [162], secondo cui il numero dei doppi legami coniugati presenti in una ficobilina incidono sulla sua λ max, dall'altro rende impossibile evidenziare e quantificare spettrofotometricamente PEC, poichè le sue λ max ricadono nel picco di assorbimento di PC [190]. Pertanto, vista la presenza di questo particolare complesso altamente resistente PC/PEC, AFA ed i suoi estratti ricchi in PCA sono senz'altro differenti strutturalmente e qualitativamente da quelli ottenibili da altri cianobatteri attualmente usati in nutraceutica.

1.6 PRINCIPALI CARATTERISTICHE ED ATTIVITÀ BIOLOGICHE DELLE PC

Le proprietà biologiche delle PC provenienti da diversi cianobatteri sono state oggetto di numerosi studi che hanno evidenziato caratteristiche interessanti e variazioni nel loro profilo di attività. Tuttavia, ad eccezione di alcuni lavori in cui ci si riferisce PCA [176, 177, 187, 188, 191, 192], queste proprietà sono state evidenziate nelle PC di altre microalghe, tra cui, per la maggior parte, in quella ottenuta da *Spirulina* (PCS).

Per poter valutare gli effetti biologici delle PC, sono stati studiati vari meccanismi di isolamento e purificazione, in modo da ottenere degli estratti con un elevato contenuto in PC e limitando la presenza di altre componenti che potrebbero interferire con gli effetti oggetto di valutazione [193-198]. La purezza delle PC è stata valutata, nella maggior parte dei casi, mediante il rapporto delle assorbanze A620/A280 dove 620 nm è la λ max di PC, mentre 280 nm quella del contenuto totale di proteine nel campione, riferendosi con essa alla contaminazione di proteine ricche di amminoacidi aromatici. Se tale rapporto risulta essere $\leq 0,7$ si parla di *food grade*, se è compreso tra 0,7 e 3,9 si parla di *reactive grade*, se tale valore è $>$ di 4,0 si parla di *analytical grade* [196, 197, 199]. Principalmente alle PC vengono riconosciute attività antiossidanti, anti-infiammatorie ed immunomodulanti. Gli effetti antiossidanti sono stati per la prima volta dimostrati da Romay et al. nella PCS [200], in cui è stata evidenziata la sua capacità di fungere da *scavenger* nei confronti di radicaliche come nel radicale idrossilico ($\cdot\text{OH}$), alcossilico ($\text{RO}\cdot$) ed anione superossido ($\text{O}_2\cdot^-$). È stato dimostrato che PCS è in grado di limitare i danni indotti da RNS ($\cdot\text{NO}$ e ONOO^-) e prevenire il danno ossidativo al DNA [196, 201] in diversi modelli cellulari *in vitro* ed *in vivo*. Benedetti et al. [176], hanno evidenziato come PCA sia in grado di inibire l'emolisi ossidativa e la perossidazione lipidica indotta da un generatore di ROS (AAPH) in eritrociti umani. L'attività di *scavenger* di radicali è stata ulteriormente confermata mediante il saggio ORAC, in cui PCA ha dimostrato di agire da *scavenger* al pari di noti antiossidanti come il Trolox [177]. Bermejo-Bescos et al. [202], hanno dimostrato in un modello cellulare *in vitro* che la PCS è in grado di inibire la citotossicità neuronale indotta da Fe^{2+} , incrementando l'espressione di GSH. Gli stessi autori hanno riportato le capacità di PCS, mediante una riduzione della sua fluorescenza, di chelare sia il Fe^{3+} ed in maniera meno efficiente il Fe^{2+} , coinvolti in numerosi processi di produzione dei radicali [203]. Ciò permette di ipotizzare che le PC siano in grado di interferire sia con la reazione di Fenton

che con quella di Haber-Weiss. Inoltre proprio il *bleaching* del cromoforo indica che la ficocianobilina è coinvolta nell'attività di *scavenger* delle PC [201]. Zheng et al. [204], hanno evidenziato come la ficocianobilina, per altro strutturalmente simile alla biliverdina, le cui attività antiossidanti sono ampiamente dimostrate [205, 206], rappresenta il composto principale attraverso cui le PC esplicano le loro attività antiossidanti, ed è probabilmente rilevante anche per le altre attività biologiche. Scoglio et al. [188], hanno dimostrato come la ficocianobilina sia responsabile dell'inibizione dell'attività dell'UDP-deidrogenasi in cellule tumorali. A conferma della attività antiossidante, chelante del ferro e della capacità di agire sulla perossidazione lipidica delle PC, Marin-Prida et al. [207], hanno dimostrato come PCS è in grado di indurre effetti favorevoli in cellule di neuroblastoma umano (SH-SY5Y) attenuando, in modo dose-dipendente, la morte cellulare e la perossidazione lipidica indotta da *terz*-butil idroperossido. A sostegno dell'attività antiossidante, altri studi hanno dimostrato come il pretrattamento con PCS protegga la permeabilità ed il potenziale di membrana dei mitocondri ed incrementi la produzione di ATP in cellule renali epiteliali esposte ad ossalato [208].

Anche per quanto riguarda la valutazione degli effetti anti-infiammatori di PCS, Romay et al. [200], è stato il primo a verificarli, utilizzando un modello *in vivo* di infiammazione indotta dalla glucosio ossidasi. In questo studio è stata evidenziata una stretta correlazione tra le proprietà di *scavenger* di PCS e quelle anti-infiammatorie. Infatti i ROS risultano essere causa ma anche effetto della cascata infiammatoria, determinando l'insorgenza di vari danni tissutali [20]. In quest'ottica gli antiossidanti possono attenuare il processo infiammatorio. Un ulteriore studio di Romay et al. [209] ha confermato l'attività anti-infiammatoria di PCS in diversi modelli infiammatori *in vivo*, risultando in grado di inibire il processo infiammatorio indotto sia da acido arachidonico, che da 12-Otetradecanoylphorbol-13-acetate, nonché da carragenina inibendo l'attivazione di COX, lipossigenasi, proteina chinasi C e la produzione di ROS in maniera dose-dipendente. Questo studio ha però dimostrato che le proprietà di *scavenging* della PCS non sono le uniche a contribuire all'attività anti-infiammatoria, ma ne costituiscono una sola parte. Altri studi hanno evidenziato la capacità di PCS di inibire l'espressione di TNF- α e la produzione di NO nel siero di topi trattati con LPS [210]; PCS è inoltre in grado di ridurre l'istamina, l'attività della mieloperossidasi ed i livelli di prostaglandine (PGE-2) e

leucotrieni (LTB-4) in tessuti infiammati [211]. Gli effetti anti-infiammatori di PCS sono stati evidenziati anche in ratti con colite indotta da acido acetico, aprendo una serie di ipotesi all'utilizzo di PCS in patologie infiammatorie croniche intestinali come la colite ulcerosa ed il morbo di Cröhn [212]. Importanti effetti anti-infiammatori sono stati dimostrati anche da Chen et al. [213] in un modello infiammatorio di cellule microgliali. Leung et al. e Sun et al. [214, 215], hanno avanzato l'ipotesi secondo cui PCS potrebbe costituire una potenziale terapia in malattie infiammatorie polmonari indotte sia da danno diretto che da infiammazione sistemica. Nel loro studio PCS è stata in grado di inibire l'attività della mieloperossidasi, la formazione di ROS, i livelli di malondialdeide, l'espressione di iNOS, COX-2, NF-Kb e TNF- α in un modello in vivo di lesione polmonare acuta. In direzione apparentemente contraria rispetto agli effetti anti-infiammatori vanno gli studi fatti da Chen H.W. et al. [216] che, seppure confermando l'inibizione della produzione di ROS da parte di PCS in macrofagi stimolati con LPS, evidenziano un effetto di immunomodulazione di PCS che si traduce nell'induzione dell'espressione di TNF- α , IL-1, IL-6 e COX. Tale differenza di risultati potrebbe essere dovuta al grado di purezza dell'estratto utilizzato inferiore all'*analytical grade*. Pugh et Pasco, [217] confermano le proprietà immunomodulanti di un estratto di AFA solubile in acqua in una linea cellulare monocitica. Altri studi hanno evidenziato come le proprietà immunomodulanti riconosciute ad AFA così come ad altri cianobatteri, non siano particolarmente dovute alla presenza di PCA [218, 219]. Tra le altre attività biologiche riconosciute a PCS rientrano quella pro-apoptotica in cellule tumorali mediante l'inibizione di proteine pro-apoptotiche come le caspasi e Bax, l'inibizione di quelle anti-apoptotiche come Bcl-2 e Bcl-XL e l'arresto del ciclo cellulare in G0/G1 [214, 220-222].

Nonostante la quantità di studi, non è ancora ben chiaro il meccanismo attraverso cui le PC permeano la cellula e/o se utilizzano uno specifico trasportatore per entrare nella cellula oppure sfruttano il processi di pinocitosi. Nishanth et al. [223], hanno localizzato la PCS in cellule HepG2 in seguito a trattamento di 24h, mediante localizzazione con la microscopia confocale. Subhashini et al. [222], hanno localizzato PCS mediante tecniche di immunofluorescenza in K562. Tuttavia è da sottolineare che in questo studio è stata utilizzata la saponina per permeabilizzare la membrana cellulare al fine di permettere l'internalizzazione degli anticorpi usati. Nello studio di Gupta et al. [224], sono state sfruttate le proprietà di fluorescenza di PCS per verificare la sua permeabilità nei timociti

dopo 24-48h di trattamento. Tuttavia tali risultati sono poco chiari. Wu et al. [225], ha riportato mediante studi di immunocolocalizzazione che PCS entra nelle cellule di melanoma metastatico (B16F10) già dopo 10 min dopo il trattamento, raggiunge il nucleo dopo 30 min ed in seguito migra nel citoplasma. Rimane ancora poco chiaro in che modo la PCS riesca ad interagire con la membrana cellulare prima di entrare nella cellula. Recenti studi hanno invece posto l'attenzione sulla veicolazione delle PC mediante dei vettori che ne facilitino l'ingresso nella cellula. A riguardo, Castangia et al. [192], hanno incapsulato la PCA in ialurosomi dimostrando, mediante studi *in vitro*, che ciò favorisce la sua deposizione negli strati profondi della pelle. Inoltre, questa metodica è altamente biocompatibile ed aumenta le attività antiossidanti di PCA rispetto al suo utilizzo in soluzione. Caddeo et al. [191] hanno dimostrato che nonostante l'uso topico di PCA sia limitato per il suo alto peso molecolare ed il suo carattere idrofilico, la sua attività come anti-infiammatorio è significativamente incrementata dall'utilizzo di particolari nanoformulazioni. In tal senso Manconia et al. [226] hanno dimostrato che anche l'inclusioni in liposomi di PCS incrementa e facilita la sua attività anti-infiammatoria. Inoltre, sebbene ad oggi la farmacocinetica delle PC sia ancora un campo piuttosto inesplorato, un recente lavoro di Minic et al. [227], ha fornito importanti conoscenze circa l'attività antiossidante ed anti-cancro dei metaboliti di PCS ottenuti mediante digestione con la pepsina, mimando in un sistema *in vitro* ciò che verosimilmente accade *in vivo* in seguito alla somministrazione orale di PCS. Complessivamente ciò che emerge è un ottimo potenziale d'azione farmacologico delle PC, sebbene non vi siano tendenze univoche circa il suo meccanismo di permeabilità nella cellula e sebbene siano carenti studi clinici riguardanti la sua farmacocinetica.

2. SCOPO DELLA RICERCA

Il nostro obiettivo principale è stato quello di valutare, per la prima volta, l'effetto di un estratto acquoso di AFA ricco in PCA (chiamato e-PC) in un modello *in vitro* di cellule muscolari esposte a stress ossidativo (perossido di idrogeno o *terz*-butil idroperossido) valutandone la sopravvivenza e la capacità differenziativa nelle diverse condizioni. Un modello cellulare adeguato per studiare *in vitro* questi fenomeni è rappresentato dalle cellule C2C12, una linea cellulare da muscolo murino in grado di proliferare e di differenziare formando prima miociti poi miotubi in modo analogo a quanto accade nell'uomo nelle cellule satellite attivate [228]. Per verificare l'esistenza o meno di effetti *cell-type specific* di e-PC, gli effetti citoprotettivi sono stati valutati anche in altri due linee cellulari umane, promonocitiche ed endoteliali, rispettivamente U937 e HUVEC. Nelle U937 è stato anche valutato l'effetto genoprotettivo nei confronti degli agenti ossidanti. Inoltre, come già evidenziato, lo stress ossidativo ed i meccanismi infiammatori sono strettamente correlati tra loro e possono essere l'uno la causa dell'altro o viceversa [20]. Pertanto un secondo obiettivo parallelo al precedente, è stato quello di verificare la capacità di e-PC di modulare l'espressione di specifici mediatori dell'infiammazione attivi nel *pathway* di TLR-4 sia nelle HUVEC che nelle C2C12 differenziate in miotubi, entrambe stimulate con LPS, un noto induttore dell'infiammazione. Allo scopo di verificare la ricaduta di eventuali modulazioni sul piano molecolare, lo studio è stato integrato da valutazioni di tipo funzionale, come i test di adesività.

3. MATERIALI E METODI

3.1 PRINCIPALI REAGENTI E COMPOSTI CHIMICI USATI

Perossido di idrogeno (H_2O_2), *terz*-butil idroperossido (tBOOH), bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), 1,10-fenantrolina monoidrato (o-Phe), Trypan Blue Solution 0,4%, dimetilsolfossido (DMSO), acido etilendiammino-tetracetico (EDTA), etidio bromuro (EB), Lipopolisaccaride (LPS), ammonio solfato e Tripsina-EDTA 0,25% sono stati acquistati da Sigma-Adrich (St. Louis, MO, U.S.A.). La soluzione di PBS pH 7,4 (7,07g/L NaCl; 1,78g/L $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$; 0,204g/L KH_2PO_4 ; 0,223g/L KCl) è stata preparata in laboratorio.

3.2 PREPARAZIONE DELL'ESTRATTO e-PC

L'estratto e-PC è stato preparato a partire dalla formulazione in polvere di AFA *fresh dried* fornita dalla Nutrateg (Urbino, Italia) come indicato da Benedetti et al. [193], con qualche modifica: 500 mg di estratto secco di AFA *fresh dried* è stato idratato in 50 mL di tampone Na-Fosfato (Na_2HPO_4/NaH_2PO_4) 100 mM a pH 7, quindi sonicato e centrifugato a 10000 x g a 4°C per 10 min. Il sovranatante di colore blu è stato raccolto e ad esso è stato aggiunto ammonio solfato ad una saturazione del 50%. La soluzione così ottenuta è stata mantenuta in agitazione a 4°C per 1h, quindi centrifugata a 10000 x g a 4°C per 30 min. Il sovranatante è stato scartato, mentre il pellet blu è stato risospeso in poco volume di tampone Na-Fosfato 100 mM a pH 7, quindi dializzato tutta la notte contro acqua. Il dializzato è stato centrifugato a 10000 x g per 15 min e filtrato consecutivamente con filtro da 0,45 μm e da 0,22 μm . La purezza dell'estratto in termini di contenuto in PCA è stata valutata attraverso l'utilizzo dello spettrofotometro (DU-640B, Beckman Coulter - USA) mediante il rapporto delle assorbanze 620 nm/280 nm, dove 620 nm rappresenta il picco delle PC, mentre 280 nm quello delle proteine totali contenute nell'estratto. Esso è stato considerato 'puro' per valori maggiori di 4 (compatibili con l'*analytical grade*). La

concentrazione molare della PCA nell'estratto è stata valutata utilizzando il suo coefficiente di estinzione molare (ϵ) a 620 nm per la forma trimerica ($\alpha_3\beta_3$) ($M_r = 121000$ Da; $\epsilon = 770000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [176, 193, 196, 201].

3.3 COLTURE CELLULARI

Le cellule U937 (monociti tumorali umani) sono state acquistate da Sigma-Aldrich e coltivate con RPMI-1640 (Corning) completato con il 10% v/v di siero fetale bovino precedentemente inattivato al calore (FBS; Corning), 2 mM L-glutamina (Lonza) ed 1% v/v di Pen/Strep (Sigma). Le cellule HUVEC (cellule endoteliali venose del cordone ombelicale) sono state acquistate da Life Technologies Corporation e coltivate utilizzando il Medium 200 completato con LSGS Kit (Gibco-Life Technologies). Le cellule sono state utilizzate per gli esperimenti nei passaggi di replicazione compresi dal P1 al P4. Le C2C12 (mioblasti murini) sono state coltivate in DMEM *high-glucose* (Carlo Erba) completato con il 10% v/v di FBS precedentemente inattivato al calore (Corning), 2 mM L-glutamina (Lonza) ed 1% v/v di Pen/Strep (Sigma), che chiameremo terreno di crescita (*Growth Medium*, GM). Lo stesso terreno è stato usato durante il differenziamento dei miociti in miotubi, ma utilizzando l'1% v/v di FBS per il completamento del medium di crescita (*Differentiation Medium*, DM). Tutte le cellule sono state mantenute in incubatore ad ambiente umidificato a 37°C e 5% di CO₂.

3.4 CONDIZIONI DI TRATTAMENTO

Citotossicità: Le C2C12 coltivate in GM sono state seminate in piastre da 12 pozzetti ad una densità di $1,5 \times 10^4$ cellule/pozzetto ed al raggiungimento del 50% di confluenza sono state trattate con concentrazioni crescenti di e-PC per 3h, quindi esposte a H₂O₂ 100 μM o tBOOH 150 μM per 1h in terreno privo di FBS. Terminato il trattamento le cellule sono state lavate in PBS e lasciate recuperare GM per ulteriori 24h. Per i saggi di citotossicità

sulle C2C12 in condizioni di differenziamento le cellule sono state seminate in piastre da 6 pozzetti e coltivate in GM fino al raggiungimento del 90% della confluenza, quindi è stato indotto il differenziamento in miotubi con il DM. Dopo 24h dal differenziamento (DifD1) le cellule sono state esposte a H₂O₂ 0,3 mM per 1h o tBOOH 1 mM per 2h in terreno privo di FBS. Terminato il trattamento le cellule sono state lavate in PBS e coltivate in DM per ulteriori 24h (DifD2).

Le cellule U937 sono state seminate ad una densità di 2x10⁵ cellule/mL e trattate con concentrazioni crescenti di e-PC per 3h o 24h, quindi esposte a 100 µM H₂O₂ o 50 µM tBOOH per 1h in terreno privo di FBS (in presenza o meno di e-PC). Terminato il trattamento le cellule sono state lavate in PBS e lasciate recuperare in RPMI 1640 completo al 10% di FBS per ulteriori 24h (in presenza o meno di e-PC).

Le cellule HUVEC sono state seminate in piastre da 24 pozzetti ad una densità di 3,5x10⁴ cellule/pozzetto e trattate con concentrazioni crescenti di e-PC per 3h quindi esposte a H₂O₂ 100 µM o tBOOH 300 µM per 1h in terreno privo di FBS. Terminato il trattamento le cellule sono state lavate in PBS e lasciate recuperare nel loro terreno di crescita per ulteriori 48h.

Genotossicità: Le cellule U937 sono state seminate ad una densità di 2x10⁵ cellule/mL e trattate con concentrazioni crescenti di e-PC per 3h, quindi esposte a H₂O₂ 1 mM o tBOOH 1 mM per 1h in terreno privo di FBS. Terminato il trattamento è stato eseguito il *Fast Halo Assay* [229].

Stimolazione con LPS: Le HUVEC sono state coltivate in piastre da 24 pozzetti o nelle fiasche da 25cm² fino al 70% di confluenza, quindi trattate con e-PC per 24h. Successivamente le cellule sono state stimulate con LPS 1 µg/mL addizionato al terreno di coltura per 6h (in presenza o meno di e-PC).

Le C2C12 sono state seminate in piastre da sei pozzetti e coltivate in GM fino al raggiungimento del 90% della confluenza, quindi è stato indotto il differenziamento in miotubi con DM. A partire dal DifD4 è stato addizionato LPS direttamente nel mezzo di coltura ogni 24h fino a 48h di trattamento come indicato da Doyle et al. [129]. L'estratto e-PC, dove presente, è stato aggiunto 30 min prima della stimolazione con LPS.

3.5 DETERMINAZIONE DELLA VITALITÀ CELLULARE E DELL'ATTIVITÀ MITOCONDRIALE

La valutazione della citotossicità è stata eseguita mediante il saggio di esclusione del colorante Trypan Blue e/o saggio dell'MTT. Nel primo caso un'aliquota di sospensione cellulare è stata risospesa in Trypan Blue 0,4% secondo opportuna diluizione, quindi è stata effettuata la conta cellulare mediante camera di Burker. I risultati sono stati espressi come percentuale di sopravvivenza tra il numero di cellule vive del campione del trattato (non colorate in quanto capaci di escludere il colorante) rispetto a quelle del controllo. Per il saggio dell'MTT le cellule sono state incubate nelle ultime 3h di trattamento con MTT 500 µg/mL, quindi lavate con PBS e risospese con DMSO. La conversione dell'MTT in formazano, ad opera dei mitocondri, evidenziata dallo sviluppo della colorazione blu/viola, che si manifesta solo nelle cellule metabolicamente attive, è stata misurata mediante analisi spettrofotometrica (Abs = 570 nm). I risultati sono stati espressi come percentuale di sopravvivenza delle condizioni di trattamento rispetto al controllo.

3.6 VALUTAZIONE DEL DANNO AL DNA

Per la valutazione della genotossicità è stato utilizzato il *Fast Halo Assay* come descritto da Sestili et al. [229]. Questa metodica permette di evidenziare la rottura dei singoli filamenti di DNA a livello della singola cellula. Dopo trattamento le cellule sono state risospese secondo opportuna diluizione in PBS freddo contenente EDTA 5 mM. Un'aliquota di tale sospensione cellulare è stata diluita in uguale volume di agarosio *low melting* 1% e immediatamente posta tra un vetrino portaoggetto, precedentemente agarizzato, ed un vetrino coprioggetto. Dopo qualche minuto in ghiaccio, il vetrino coprioggetto è stato rimosso ed i vetrini portaoggetto sono stati immersi per 15 min in una soluzione di NaOH 0,3 M contenente EDTA 0,1 mM. Negli ultimi 5 min di incubazione a tale soluzione sono stati aggiunti 10 µg/mL di EB. In queste condizioni i frammenti di DNA a singolo filamento diffondono radialmente rispetto al nucleo, generando un'immagine fluorescente che assomiglia ad un alone concentrico. Tanto maggiore è l'alone quanto maggiore è il danno al DNA. Le immagini sono state acquisite usando il

microscopio a fluorescenza Leica DMLB/DFC300F (Leica Microsystem, Wetzlar, Germany) con un obiettivo 20x ed analizzate mediante il software ImageJ 1.50i. Per ogni condizione sperimentale sono state acquisite cinque foto casuali per campo.

3.7 SAGGIO DELLA CAPACITÀ CHELANTE DEL FERRO

Per verificare la capacità di e-PC di interferire con il Fe^{2+} o Fe^{3+} è stato registrato lo spettro di assorbimento di e-PC (1,8 μM che corrispondono a 0,2 mg/mL) in presenza o in assenza di differenti concentrazioni di FeSO_4 e di FeCl_3 come indicato da Bermejo et al. [203]. L'aumento della concentrazione dei metalli causa una diminuzione del picco di assorbimento delle PC, accompagnato dalla loro decolorazione. L'analisi è stata eseguita utilizzando una cuvetta in quarzo. La soluzione contenente e-PC e le diverse concentrazioni dei metalli sono state incubate a 25°C per 15 min prima della lettura allo spettrofotometro (DU-640B, Beckman Coulter - USA). Lo spettro ottenuto è stato comparato con quello ottenuto da e-PC senza la presenza di ferro.

3.8 SAGGIO DI ADESIVITÀ CELLULARE

Il saggio di adesività cellulare, eseguito secondo la metodica di Fraternali et al. [97], ci ha permesso di verificare l'adesione dei monociti umani sulle cellule endoteliali in seguito alla stimolazione di queste ultime con un agente infiammatorio (LPS). In breve, le HUVEC sono state seminate in piastre da 24 pozzetti, quindi trattate con diverse concentrazioni di e-PC e stimolate con LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) per le 6h seguenti. Successivamente in ogni pozzetto sono state addizionate le U937 (2×10^5), tenute in co-cultura con le HUVEC per 1h. Al termine del trattamento le U937 non adese sono state rimosse mediante tre lavaggi con PBS. Per ogni condizione sperimentale sono state acquisite sei immagini casuali per campo utilizzando il microscopio ottico rovesciato Olympus CKX41 (obiettivo 10x). Le U937 rimaste adese sono state contate mediante l'utilizzo del software ImageJ

1.50i e sono state espresse come il numero di cellule adese per campo rispetto al numero di HUVEC (U937/HUVEC per campo).

3.9 ISOLAMENTO DELL'RNA E PCR QUANTITATIVA REAL TIME (qRT-PCR) DI miRNA MATURI

Per estrarre l'RNA totale delle cellule (HUVEC e C2C12) è stato utilizzato il Kit di purificazione Total RNA purification Norgen (Biotek Corporation, Thotold, Canada) seguendo il protocollo suggerito dal produttore che permette l'isolamento dell'RNA totale comprendente sia miRNA che specie di RNA più lunghi (mRNA). L'RNA è stato conservato a -80°C fino al momento dell'utilizzo. L'espressione dei miR-146a, miR-126a e RNU44 o U6 (piccoli RNA endogeni di riferimento usati come normalizzatori) è stata quantificata mediante TaqMan MicroRNA Assay (Applied Biosystem). Per retrotrascrivere l'RNA totale è stato usato il TaqMan MicroRNA Reverse Trascrizione Kit; in cui 5 µL di RT mix contenevano 1 µL di primer stem-loop specifico per ogni miRNA, 1,67 µL di campione di RNA, 0,4 µL di dNTP 10 mM, 0,3 µL di trascrittasi inversa, 0,5 µL di buffer 10x, 0,6 µL di inibitore delle RNasi diluito 1:10 e 0,55 µL di H₂O. La miscela è stata incubata a 16°C per 30 min, 42°C per 30 min e 85°C per 5 min. Successivamente è stata eseguita la qRT-PCR, dove i 20 µL di PCR mix contenevano 1 µL di soluzione 20x TaqMan MicroRNA Assay (in cui erano contenute sonde e primer 5'FAM), 10 µL di soluzione 2x TaqMan Universal Master mix non AmpErase UNG (Applied Biosystem), 5 µL del prodotto di retro-trascrizione e 7,67 µL H₂O. La reazione è stata incubata a 95°C per 10min, quindi sono stati eseguiti 40 cicli a 95°C per 15 s e 60°C per 1 min. La qRT-PCR è stata eseguita con ABI Prism 7500 Real Time PCR system (Applied Biosystem). I dati sono stata analizzati con il software 7500 system (versione 1.4.0) che confronta automaticamente i valori del ciclo soglia (Ct) dei campioni nel ciclo della reazione di amplificazione in cui il segnale di fluorescenza è maggiore rispetto al Ct impostato. La soglia di rilevamento è stata fissata a 35 Ct. La quantità relativa di espressione di ogni miRNA è stata calcolata per differenza dei Ct tra il miRNA di interesse e quello del normalizzatore nelle condizioni di trattamento rispetto al controllo, secondo il metodo del $2^{-\Delta\Delta Ct}$, dove $\Delta\Delta Ct = \Delta E - \Delta Ct$; $\Delta E = Ct$ (miRNA del trattato) - Ct (RNU44 o U6 del trattato); $\Delta Ct = Ct$ (miRNA del controllo) - Ct (RNU44 o U6 del

controllo). Le variazioni di espressione dei miRNA sono state indicate come incremento dell'espressione rispetto al controllo (controllo = 1).

3.10 PCR QUANTITATIVA REAL TIME (qRT-PCR) DI mRNA MATURI

L'RNA totale delle HUVEC è stato estratto utilizzando il Kit di purificazione Total RNA purification Norgen (Biotek Corporation, Thotold, Canada) seguendo il protocollo suggerito dal produttore. Di ogni campione è stato quantificato l'acido nucleico presente mediante l'utilizzo dello spettrofotometro Nano-Drop ND-1000 (NanoDrop Technologies, USA). L'RNA isolato è stato successivamente retro-trascritto in cDNA mediante l'utilizzo del kit di retro-trascrizione (Applied Biosystem) secondo le indicazioni del produttore. La qRT-PCR è stata eseguita con ABI Prism 7500 Real Time PCR system (Applied Biosystem) utilizzando una SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystem). Le coppie di *primers forward* e *reverse* utilizzate sono riportate in Tabella 2. Per determinare l'espressione relativa dei mRNA è stato utilizzato il normalizzatore endogeno TATA-legante (TBP) ed i risultati sono stati espressi come variazione di espressione rispetto al campione di controllo.

Tabella 2. Sequenze dei primers utilizzati per la qRT-PCR

Gene	Forward primer (5'- 3')	Reverse primer (5'- 3')
ICAM-1	TGGCCCTCCATAGACATGTGT	TGGCATCCGTCAGGAAGTG
VCAM-1	ACAGAAGAAGTGGCCCTCCAT	TGGCATCCGTCAGGAAGTG
IL-6	AGGGCTCTTCGGCAAATGTA	GAAGGAATGCCCATTAACAACAA
IRAK-1	CAGACAGGGAAGGGAAACATTTT	CATGAAACCTGACTTGCTTCTGAA
TBP	TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA	CACATCACAGCTCCCCACCA

3.11 SAGGIO DELLA B-GALATTOSIDASI ASSOCIATA ALLA SENESCENZA CELLULARE

La β -galattosidasi è un enzima in grado di idrolizzare i residui terminali di β -D-galattosio dei polisaccaridi mediante la rottura dei legami beta-glicosidici. Essa risulta essere sovra espressa nelle cellule in fase di senescenza replicativa ed è rilevabile mediante un saggio colorimetrico a pH 6. Lo stato senescente delle cellule HUVEC è stato valutato mediante colorazione della β -galattosidasi associata alla senescenza (SA- β -gal) (Sigma-Aldrich) come descritto da Fraternali et al. [97]. Le HUVEC sono state coltivate in piastre da sei pozzetti fino al raggiungimento del 50% della confluenza quindi sono state lavate due volte in PBS e fissate per 10 min con formaldeide 2% (p/v) e glutaraldeide 0,2 % (p/v). Le cellule sono state poi lavate due volte in PBS e incubate per tutta la notte a 37°C con una soluzione fresca contenente acido citrico 40 mM titolato con NaH_2PO_4 a pH6, $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 5 mM, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 5 mM, NaCl 150 mM, MgCl_2 2 mM, 1 mg/mL X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galattopiranoside). Trascorso il periodo di incubazione le cellule sono state lavate 2 volte con PBS ed osservate al microscopio ottico rovesciato Olympus CKX41 (obiettivo 10x). L'attività enzimatica è stata dimostrata mediante la presenza di un precipitato intracellulare insolubile di colore blu. La percentuale di cellule senescenti è stata calcolata contando il numero di cellule blu (positive per la β -galattosidasi) su un totale di almeno 500 cellule.

3.12 SAGGIO DI IMMUNOASSORBIMENTO LEGATO AD ENZIMA (ELISA) PER LA VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI VCAM-1

L'espressione della proteina VCAM-1 sulla superficie delle cellule HUVEC è stata valutata mediante la metodica ELISA come indicato da Kang et al. [230], con qualche modifica. Le cellule HUVEC sono state seminate in piastre da 96 pozzetti alla densità di 1×10^4 cellule/pozzetto ed al raggiungimento del 70% della confluenza sono state trattate con l'estratto e-PC (100 nM) per 24h e successivamente stimulate con LPS (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) per ulteriori 24h. Dopo l'incubazione le cellule sono state lavate in PBS e fissate per 30 min a temperatura ambiente con 4% (w/v) di paraformaldeide. Dopo 3 lavaggi in PBS le cellule

sono state bloccate con TBS, 1% BSA e 0,05% Tween 20 per 15 min al fine di ridurre legami aspecifici. È stato poi aggiunto l'anticorpo primario anti-VCAM-1 (Santa Cruz Biotechnology SC-13160 1:50) per 1h. È stato quindi aggiunto l'anticorpo secondario horseradish-peroxidase-conjugated goat anti-mouse (BioRad, 1:500) per 45 min. Al termine dell'incubazione le cellule sono state lavate con PBS ed esposte al substrato ABTS (KPL). L'assorbanza è stata determinata a 405 nm mediante lettura spettrofotometrica con ELISA microplate reader (BioRad).

3.13 MISURAZIONE DEL DIAMETRO DEI MIOTUBI

Il diametro dei miotubi trattati con LPS in presenza o meno dell'estratto e-PC è stato misurato utilizzando la metodica indicata da alcuni autori [129, 231] con qualche modifica. In breve, per ogni condizione sperimentale sono stata acquisite 5 foto casuali per campo utilizzando il microscopio ottico rovesciato Olympus CKX41 (obiettivo 20x). I miotubi sono stati misurati in 5 punti della loro lunghezza. L'analisi è stata eseguita mediante il software ImageJ 1.50i ed i risultati sono stati espressi come variazione rispetto al gruppo di controllo.

3.14 ESTRAZIONE DELLE PROTEINE, ELETTROFORESI E WESTERN BLOT

L'estrazione delle proteine ed il *western blot* nelle C2C12 sono stati eseguiti come indicato da Guescini et al. [232]. Le proteine totali sono state estratte usando il tampone RIPA. Il pellet di proteine così ottenuto è stato risospeso in ISOT *buffer* (urea 8 M, CHAPS 4%, DTE 65 mM, Tris base 40 mM) e sonicato per 5 s in ghiaccio. La concentrazione di proteine è stata determinata mediante il saggio di Bradford [233]. Le proteine totali sono state risospese in Laemmli *sample buffer* 6x e separate per elettroforesi su un gel SDS-PAGE al 10%. Successivamente le proteine sono state trasferite sulla membrana PVDF di 0,45 µm (GE Healthcare). Le membrane sono state incubate over night a 4°C con anticorpi primari specifici (mouse anti-myosin heavy chain – Santa Cruz Biotech) e successivamente

lavate ed incubate con l'anticorpo secondario (horseradish-peroxidase-conjugated goat anti-mouse - Pierce). Gli immunocomplessi sono stati visualizzati usando il *Supersignal Dura Reagent* (Pierce) e le lastre radiografiche ottenute sono state digitalizzate ed analizzate mediante il software Image Studio Lite v5.2 (Licor).

3.15 SAGGIO DELLA MIGRAZIONE CELLULARE NELLA RIMARGINAZIONE DI GRAFFI AL MONOSTRATO

Questo saggio permette di valutare la migrazione cellulare in seguito alla produzione di tagli (graffi) eseguiti meccanicamente su un tappeto cellulare, un modello semplificato rappresentativo *in vitro* della rimarginazione delle ferite *in vivo*. Il saggio è stato eseguito sia sulle HUVEC che sulle C2C12 come indicato da Liu et al. [234] con qualche modifica. In breve, le HUVEC sono state seminate in terreno completo in piastre da 12 pozzetti ad una densità di $3,5 \times 10^4$ cellule, mentre le C2C12 sono state seminate in GM in piastre da 6 pozzetti ad una densità di 2×10^5 . In entrambi i casi le cellule sono state fatte crescere fino alla semi-confluenza, quindi trattate con diverse concentrazioni di e-PC per 24h. Dopo l'incubazione, lo strato di cellule è stato lesionato con un puntale. Il terreno di coltura e le cellule in sospensione sono state rimosse, mentre quelle in adesione sono state addizionate di terreno fresco ed esposte ad LPS ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) con o senza e-PC per diverse ore di trattamento. La migrazione cellulare è stata monitorata a tempi differenti dal taglio mediante il microscopio ottico rovesciato Olympus CKX41 (obiettivo 4x). Per ogni condizione di trattamento sono state acquisite 4 foto lungo il taglio. Le immagini sono state analizzate attraverso il software ImageJ 1.50i valutando l'area della ferita ai differenti tempi di trattamento rispetto all'area al momento del taglio (T_0). I dati sono stati espressi come variazione dell'area rispetto al T_0 .

3.16 ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica è stata eseguita usando GraphPad Prism 6.0. I dati sono stati espressi come valori medi \pm SEM, salvo diversa specificazione. Per ogni analisi sono state eseguiti almeno tre esperimenti indipendenti. La significatività della differenza tra i valori medi ottenuti per ogni condizione di trattamento rispetto al controllo e/o rispetto ad un trattato di riferimento è stata calcolata, a seconda delle diverse condizioni sperimentali, usando il test *t* di Student, il test One-way ANOVA o il test Two-way ANOVA (ed il post test Dunnett). La differenza tra i campioni è stata considerata significativa con $p < 0,05$.

4. RISULTATI

4.1 PREPARAZIONE DELL'ESTRATTO e-PC

L'estratto e-PC è stato preparato a partire dalla polvere della microalga AFA fornitaci dalla Nutratec (Urbino, Italia), in accordo con la metodica [176, 193], schematicamente rappresentata nella figura 11

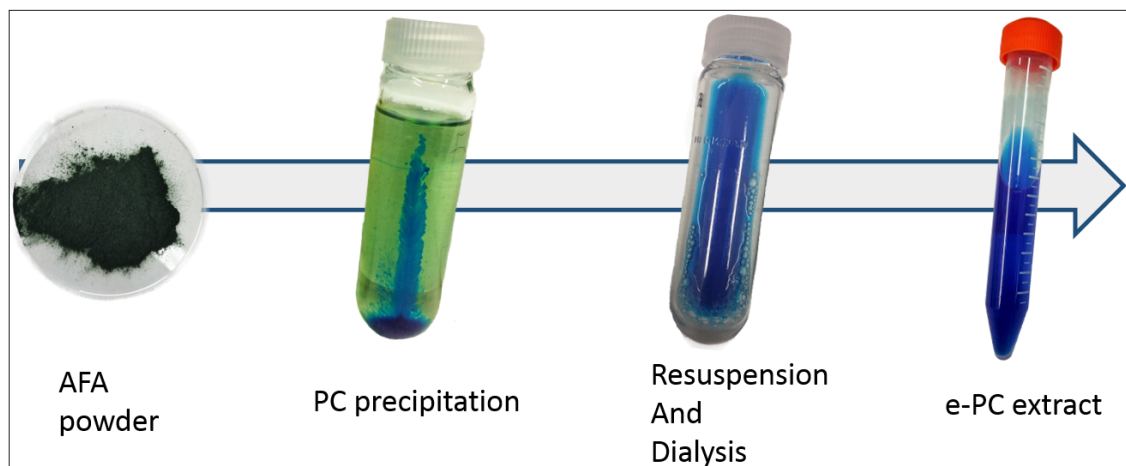


Figura 11. Rappresentazione schematica della preparazione di e-PC. AFA è idratata con buffer Na-P, quindi sonicata e centrifugata. Successivamente mediante la precipitazione in ammonio solfato è stata precipitata la PCA, la quale una volta risospesa in buffer Na-P è stata dializzata tutta la notte contro acqua. Il dializzato (e-PC), ulteriormente centrifugato e filtrato, è stato conservato a -80°C fino al momento dell'utilizzo.

Una volta ottenuto l'estratto, la sua purezza in termini di contenuto in PCA è stata valutata attraverso l'utilizzo dello spettrofotometro mediante il rapporto delle assorbanze $620\text{ nm}/280\text{ nm}$, dove 620 nm rappresenta il picco delle PC, mentre 280 nm quello delle proteine totali contenute nell'estratto (figura 12).

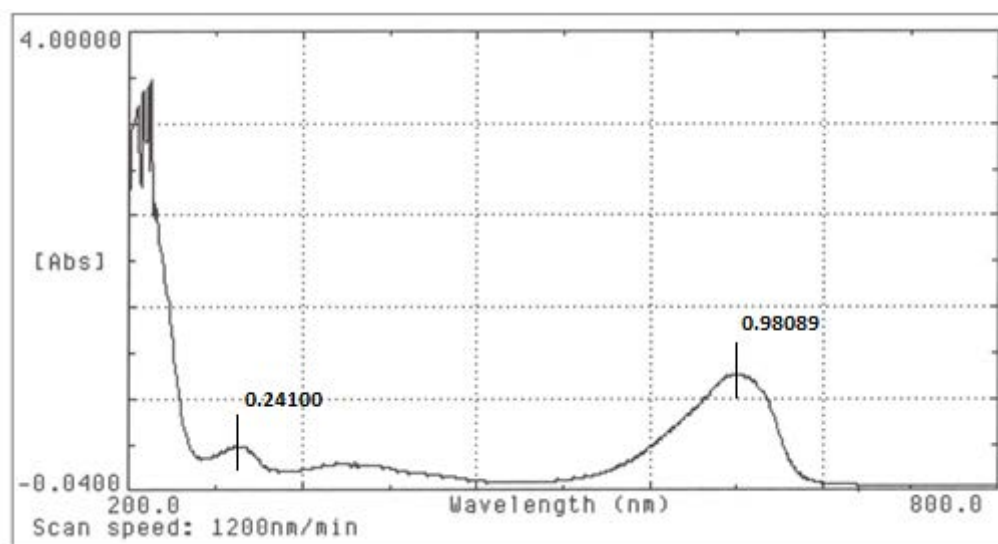


Figura 12. Scansione spettrofotometrica dell'estratto e-PC. La scansione spettrofotometrica di e-PC ha rivelato la presenza di un picco a 620 nm = 0,98089 e di un picco a 280 nm = 0,24100.

In accordo con la letteratura presente, e-PC è stato considerato 'puro' poiché il rapporto delle assorbanze è risultato maggiore di 4 (4,07). La concentrazione molare della PCA nel nostro estratto è stata valutata utilizzando il suo coefficiente di estinzione molare (ϵ) a 620 nm per la forma trimerica ($\alpha_3\beta_3$) ($M_r = 121000$ Da; $\epsilon = 770000$ $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Ciò significa che una soluzione 1M presenta un'assorbanza di 770000. Pertanto, tenendo conto della nostra scansione e della diluizione utilizzata nell'analisi, abbiamo calcolato la concentrazione molare di PCA nell'estratto e-PC secondo l'equazione di seguito:

$$[PC] = \left(\frac{O.D. 620nm}{770000} \right) \times 10$$

dove 10 indica il fattore di diluizione utilizzato, O.D. 620 nm indica l'assorbanza di PC e 770000 il suo $E_{1\text{cm}}^{1\%}$. Da questo calcolo è emerso che la concentrazione di PCA in e-PC è di 12,7 μ M. L'estratto è stato aliquotato e conservato a -80°C fino al momento dell'utilizzo al riparo dalla luce rivelandosi stabile se conservato a 4°C per una settimana. Nel testo ci riferiamo alla molarità di e-PC intendendo quella della PCA contenuta in esso.

4.2 CARATTERIZZAZIONE DEL PROFILO TOSSICOLOGICO DI e-PC

Una volta ottenuto l'estratto ne abbiamo caratterizzato il profilo tossicologico sulle cellule C2C12 al fine di individuare le concentrazioni sub-tossiche da utilizzare per gli esperimenti di citoprotezione (Figura 13). Le cellule sono state esposte a concentrazioni crescenti di e-PC per 24h, al termine delle quali è stata calcolata la vitalità cellulare mediante saggio MTT. Abbiamo quindi calcolato le concentrazioni di e-PC alle quali si verifica il 20% ed il 50% dell'inibizione della proliferazione (rispettivamente IC 20 ed IC 50).

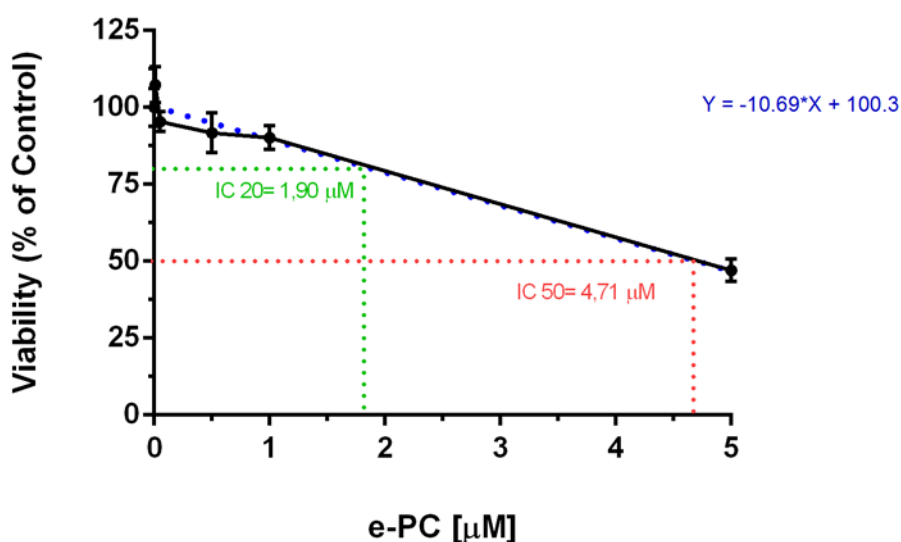


Figura 13. Saggio dell'MTT di C2C12 esposte ad e-PC. Le C2C12 sono state seminate, in triplicato, su piastre da 96 pozzetti ad una densità di 1×10^4 cellule/pozzetto e coltivate in GM fino al raggiungimento del 50% della confluenza. Successivamente sono state esposte a concentrazioni crescenti di e-PC e lasciate crescere in GM per le successive 24h, al termine del quale è stata valutata la vitalità cellulare mediante saggio MTT. Sono stati eseguiti tre esperimenti indipendenti.

Nel nostro modello cellulare e-PC inibisce la proliferazione cellulare del 20% e 50% rispettivamente a 1,90 µM e 4,71 µM. Per gli esperimenti successivi abbiamo quindi utilizzato un range di concentrazioni inferiore alla IC 20, al fine di evitare anche in minima parte l'inibizione della proliferazione cellulare.

4.3 VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ CITOPROTETTIVA DI e-PC

4.3.1 Attività citoprotettiva di e-PC in U937

Prima di passare a verificare l'effetto citoprotettivo di e-PC nelle C2C12, come previsto nel nostro lavoro, ci siamo serviti di un modello cellulare meno complesso sia per indagarne gli eventuali effetti di citoprotezione sia da usare ai fini comparativi e meccanicistici. Abbiamo utilizzato tre differenti protocolli sperimentali per verificare se e-PC fosse in grado di prevenire, dopo 24h dal trattamento, l'inibizione della proliferazione cellulare indotta da perossidi organici (tBOOH) ed inorganici (H_2O_2) sulle U937. Lo stress ossidativo è infatti in grado di innescare una serie di danni cellulari che si evidenziano ovviamente nell'inibizione della proliferazione cellulare. La scelta della concentrazione dei perossidi da utilizzare per i trattamenti deriva da studi preliminari analoghi a quelli descritti per le C2C12 (dati non mostrati). Per il H_2O_2 e per tBOOH abbiamo scelto delle concentrazioni che, dopo le 24h dal trattamento, riducevano il numero di cellule del 50% rispetto al controllo, un valore adeguato a evidenziare eventuali effetti protettivi di e-PC. Nel primo protocollo sperimentale (Figura 14 A-A') le U937 sono state pre-incubate con diverse concentrazioni di e-PC per un periodo di 24h, al termine del quale sono state trattate con H_2O_2 (Figura 14-A) o tBOOH (Figura 14-A') per 1h in assenza dell'estratto. Al termine del trattamento le cellule sono state riseminate in terreno fresco per ulteriori 24h. La vitalità cellulare è stata valutata mediante saggio del Trypan Blue (paragrafo 3.5). I risultati hanno evidenziato una modesta, ma significativa e dose-dipendente, attività citoprotettiva di e-PC sull'inibizione della proliferazione cellulare indotta da perossidi inorganici, mentre tale attività è maggiore nei confronti dei perossidi organici (citoprotezione del 20% nel H_2O_2 vs 49% nel tBOOH alla concentrazione di e-PC 1 μM).

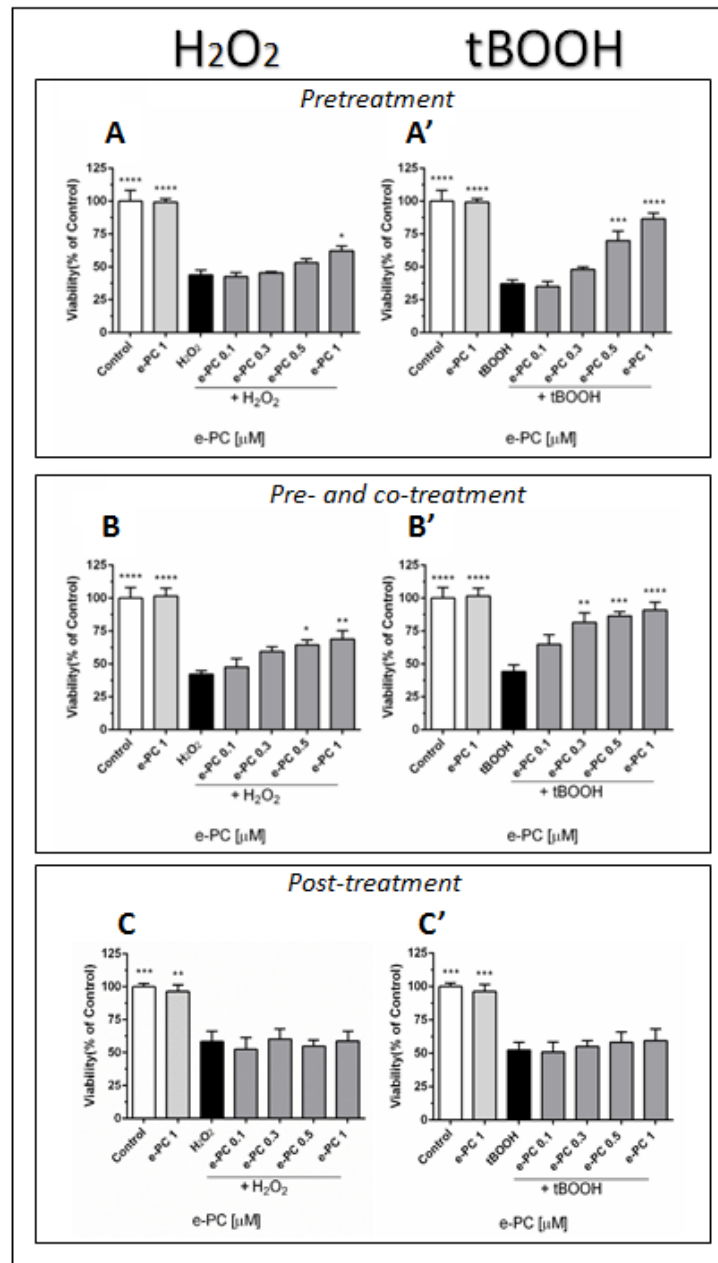


Figura 14. Effetto di e-PC sulla vitalità di U937, esposte a stress ossidativo indotto da H₂O₂ o tBOOH. (A-A') Le U937 sono state incubate 24h con diverse concentrazioni di e-PC (da 0,1 a 1 μM) in RPMI completo, poi trattate per 1h con H₂O₂ 100 μM (A) o tBOOH 50 μM (A') in RPMI senza FBS. Al termine del trattamento le cellule sono state riseminate in terreno completo per ulteriori 24h senza e-PC né perossidi. (B-B') Le U937 sono state incubate 3h con diverse concentrazioni di e-PC (da 0,1 a 1 μM), poi trattate per 1h con H₂O₂ 100 μM (B) o tBOOH 50 μM (B'), in presenza di e-PC, in RPMI senza FBS. Al termine del trattamento le cellule sono state riseminate in terreno completo per ulteriori 24h senza e-PC né perossidi. (C-C') Le U937 sono state trattate per 1h con H₂O₂ 100 μM (C) o tBOOH 50 μM (C'), in assenza di e-PC ed in RPMI senza FBS. Al termine del trattamento le cellule sono state riseminate in terreno completo per ulteriori 24h con e-PC ma senza perossidi. La citotossicità è stata valutata, al termine delle 24h di recovery mediante conta con Trypan Blue. I dati sono espressi come media ± SEM di cinque esperimenti indipendenti. Per l'analisi statistica è stato eseguito il test statistico One-way Anova ed il post-test Dunnett. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ rispetto ai trattati con solo H₂O₂ o tBOOH.

Nel secondo protocollo, pre- e co-incubazione (Figura 14 B-B') le U937 sono state trattate con e-PC per 3h e poi esposte a H₂O₂ (Figura 14-B) o tBOOH (Figura 14-B') per 1h in presenza dell'estratto. Al termine del trattamento le cellule sono state riseminate in terreno fresco senza e-PC e la vitalità cellulare valutata dopo 24h. In questo caso e-PC esercita una buona protezione sull'inibizione della proliferazione indotta da tBOOH e inferiore ma comunque significativa alla dose più elevata nei confronti dell'H₂O₂ (citoprotezione del 26% nel H₂O₂ vs 47% nel tBOOH alla concentrazione di e-PC 1 μM). In entrambi i casi è evidente un effetto dose-risposta. La presenza di e-PC durante la fase dello stress ossidativo contrasta tendenzialmente meglio, rispetto al protocollo con sola pre-incubazione l'azione citotossica degli ossidanti, in particolare a concentrazioni inferiori a 1 μM.

Nel terzo protocollo le U937 sono state trattate come nel protocollo precedente, ma e-PC è stato presente solo nelle 24h successive al trattamento (Figura 14 C-C'). Come evidente, l'aggiunta di e-PC nella sola fase di recovery non produce alcuna citoprotezione. Pertanto, possiamo supporre che e-PC non agisca incrementando i meccanismi di rimozione dei danni indotti dallo stress ossidativo, quanto piuttosto interferisca con il meccanismo radicalico con cui vengono prodotti. Concordemente con questa ipotesi, nonostante con il solo pre-trattamento si evidenzia già un effetto protettivo, la presenza di e-PC durante l'esposizione agli agenti ossidanti tende ad aumentarne l'efficacia.

4.3.2 Attività citoprotettiva di e-PC in C2C12

Sulla base dei risultati ottenuti con le U937 siamo passati alla valutazione degli effetti citoprotettivi di e-PC sia nelle C2C12 allo stato di mioblasti che durante differenziamento in miotubi. Le cellule sono state trattate come indicato nella sezione materiali e metodi (paragrafo 3.4). La citotossicità sui mioblasti è stata valutata tramite saggio di esclusione del colorante Trypan Blue usando come controllo positivo o-Phe, un noto chelante del ferro.

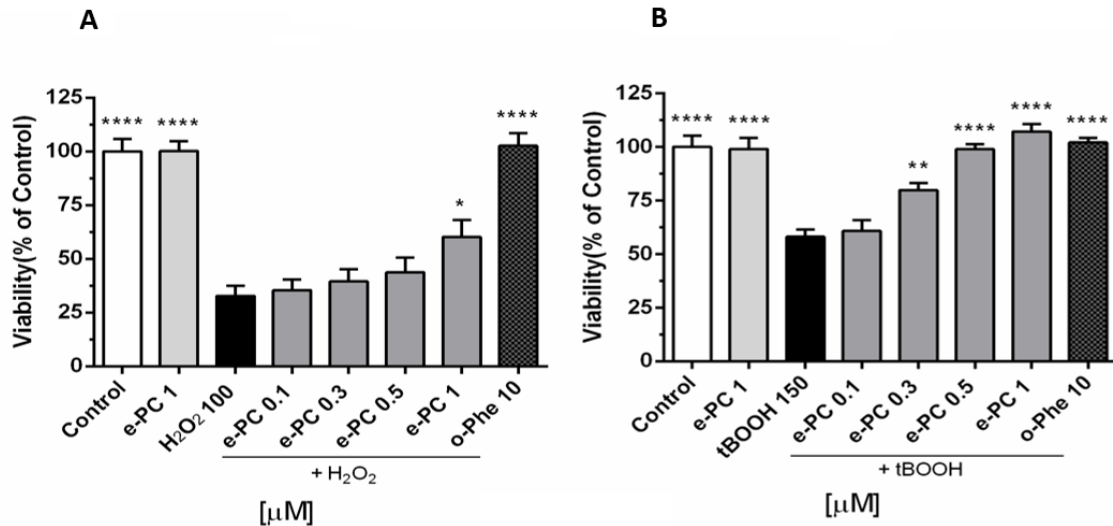


Figura 15. Effetto di e-PC sulla vitalità delle C2C12 (mioblasti) esposte a stress ossidativo indotto da H₂O₂ e tBOOH. Le cellule sono state incubate 3h con diverse concentrazioni di e-PC (da 0,1 a 1 μM) in GM, poi trattate per 1h con H₂O₂ 100 μM (A) o tBOOH 150 μM (B), in presenza di e-PC, in DMEM senza FBS. Al termine del trattamento le cellule sono state riseminate in GM per ulteriori 24h senza e-PC né perossidi. La citotossicità è stata valutata, al termine delle 24h di recovery, mediante saggio di esclusione del colorante Trypan Blue. Per ogni trattamento, come controllo positivo è stata utilizzata o-Phe 10 μM, aggiunta 15' prima dei perossidi. I dati sono espressi come media ± SEM di cinque esperimenti indipendenti. One-way Anova e Dunnett post-hoc. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ rispetto ai trattati con solo H₂O₂ o tBOOH.

Come si può vedere dalla figura 15, e-PC induce una modesta citoprotezione nei confronti dell'H₂O₂ (significativa solo a 1 μM, Figura 15-A) ed una completa protezione nei confronti della citotossicità indotta da tBOOH (Figura 15-B). È evidente una citoprotezione maggiore nei confronti del danno indotto dal tBOOH rispetto a quello indotto dal H₂O₂ (citoprotezione del 28% nel H₂O₂ vs 49% nel tBOOH alla concentrazione di e-PC 1 μM). Come prevedibile l'azione citotossica dei perossidi è stata completamente inibita da o-Phe.

Siamo successivamente passati a verificare gli effetti citoprotettivi sulle C2C12 in via di differenziamento al DifD2 (Figura 16). Come saggio per valutare la proliferazione cellulare abbiamo utilizzato l'MTT, in quanto la conta cellulare, utilizzata nel saggio di esclusione del colorante Trypan Blue, risulta essere alquanto complicata e poco precisa nella fase del differenziamento cellulare, dove i miociti si iniziano a fondere in miotubi. Anche in questo caso lo stress ossidativo è stato indotto sia mediante perossidi organici che inorganici e come controllo positivo è stata utilizzata o-Phe.

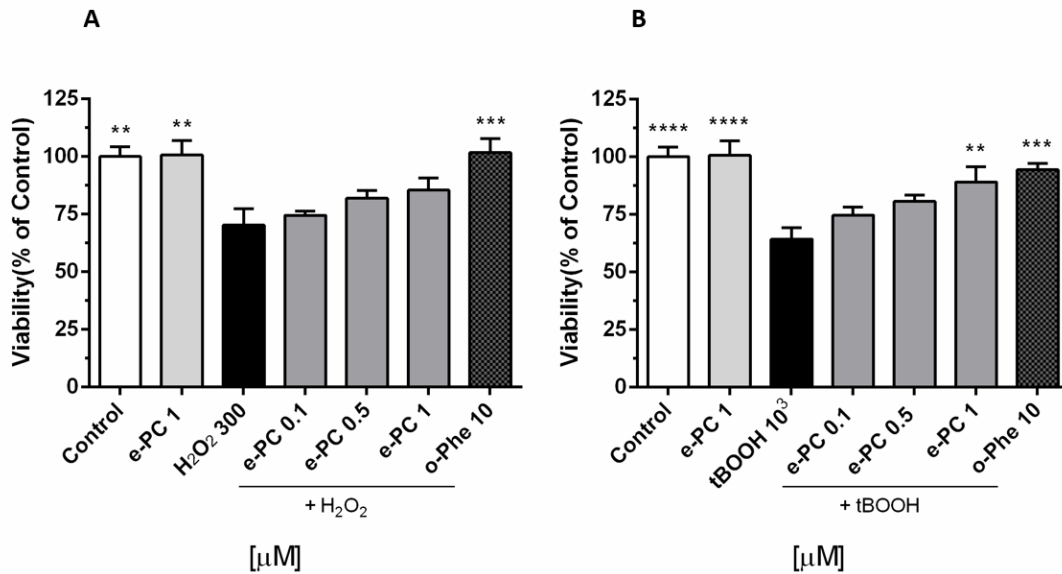


Figura 16. Effetto di e-PC sulla vitalità delle C2C12 in differenziamento (DifD2) esposte a stress ossidativo indotto da H₂O₂ e tBOOH. Le C2C12 al DifD1 sono state incubate 3h con diverse concentrazioni di e-PC (da 0,1 a 1 μM) in DM, poi trattate per 1h con H₂O₂ 300 μM (A) o 2h con tBOOH 1 mM (B), in presenza di e-PC, in DMEM senza FBS. Al termine del trattamento le cellule sono state mantenute in DM per ulteriori 24h senza e-PC né perossidi. La citotossicità è stata valutata, al termine delle 24h di recovery (DifD2) mediante saggio MTT. Per ogni trattamento, come controllo positivo è stata utilizzata o-Phe 10 μM, aggiunta 15' prima dei perossidi. I dati sono espressi come media ± SEM di tre esperimenti indipendenti, ognuno eseguito in duplicato. È stato eseguito il test statistico One-way Anova ed il post-test Dunnett. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ rispetto ai trattati con solo H₂O₂ o tBOOH.

Come mostrato nella figura 16, e-PC esercita una scarsa e solo tendenziale attività citoprotettiva nei confronti dello stress indotto da H₂O₂ (Figura 16-A) ed una attività nei confronti del tBOOH (Figura 16-B) statisticamente significativa alla concentrazione di e-PC 1 μM. L'o-Phe ha protetto completamente le C2C12 dall'effetto citotossico dei perossidi. Inoltre, e-PC da solo non ha dimostrato alcun incremento nell'attività di riduzione dell'MTT rispetto a quella del controllo: ciò indica che l'attività mitocondriale è immutata e suggerisce indirettamente che e-PC non è in grado di indurre effetti trofici sulle C2C12 in differenziamento. Gli effetti di protezione dalla citotossicità non sono associati però alla capacità di ripristinare il pieno potenziale miogenico delle C2C12 che, pur protette dalla citotossicità dei perossidi, non riescono a differenziare i miotubi maturi (dati non mostrati).

4.3.3 Attività citoprotettiva di e-PC in HUVEC

Al fine di verificare l'assenza di specificità cellulare dell'effetto citoprotettivo di e-PC, abbiamo utilizzato un terzo sistema cellulare. Le HUVEC (cellule endoteliali della vena del cordone ombelicale) sono il modello cellulare che meglio rappresenta l'endotelio vasale umano. Le HUVEC sono soggette a senescenza replicativa, parametro particolarmente importante ai fini delle risposte cellulari quali la sensibilità, la tossicità o la suscettibilità a stimoli infiammatori (paragrafo 2.1). Pertanto, per gli esperimenti abbiamo utilizzato passaggi precoci, compresi tra il primo ed il quarto. Come parametro di senescenza delle cellule abbiamo utilizzato il saggio della β -galattosidasi. Al passaggio 4 le cellule senescenti rappresentavano non più del 10-12% della popolazione totale (dati non mostrati), consentendoci di affermare che le nostre colture non erano affette da senescenza.

La citotossicità sulle HUVEC indotta da H_2O_2 e dal tBOOH è stata valutata mediante saggio del Trypan Blue. In questo caso la concentrazione di perossidi utilizzata è stata quella in grado di ridurre la vitalità cellulare del 50% dopo 48h dal trattamento, essendo questo il *doubling time* medio delle HUVEC. La figura 17 mostra che, analogamente a quanto già evidenziato nelle C2C12 e U937, e-PC ha un effetto citoprotettivo maggiore nei confronti del danno indotto da tBOOH (citoprotezione del 21% nel H_2O_2 vs 33% nel tBOOH alla concentrazione di e-PC 1 μ M).

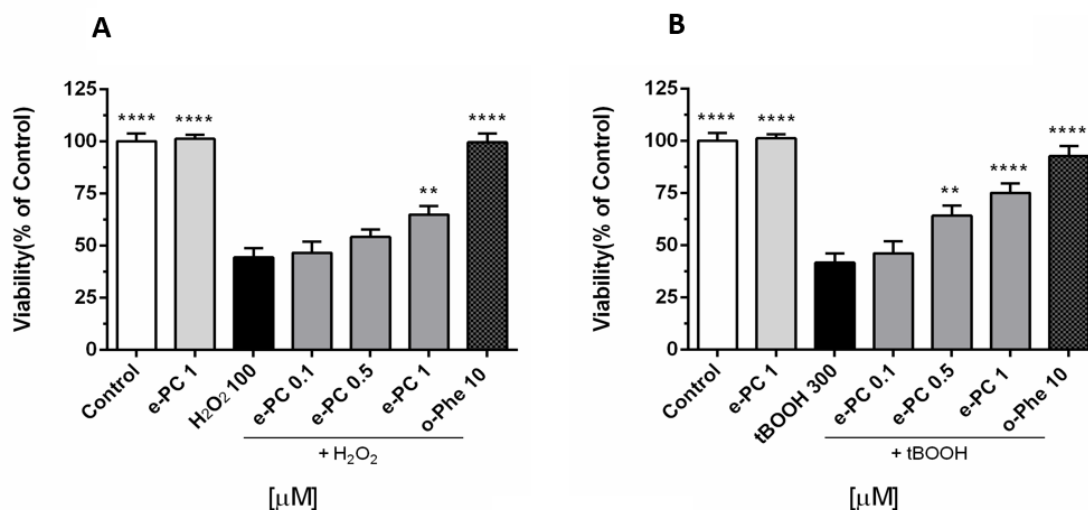


Figura 17. Effetto di e-PC sulla vitalità delle HUVEC esposte a stress ossidativo indotto da H₂O₂ e tBOOH. Le HUVEC sono state incubate 3h con diverse concentrazioni di e-PC (da 0,1 a 1 μM) in terreno completo, poi trattate per 1h con H₂O₂ 100 μM (A) o con tBOOH 300 μM (B), in presenza di e-PC, in terreno senza siero. Al termine del trattamento le cellule sono state mantenute in terreno completo per ulteriori 48h senza e-PC né perossidi. La citotossicità è stata valutata, al termine delle 48h di recovery mediante saggio di esclusione del colorante Trupan Blue. Per ogni trattamento, come controllo positivo è stata utilizzata o-Phe 10 μM, aggiunta 15' prima dei perossidi. I dati sono espressi come media ± SEM di cinque esperimenti indipendenti. Per l'analisi statistica è stato eseguito il test One-way Anova ed il post-test Dunnett. ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ rispetto ai trattati con solo H₂O₂ o tBOOH.

4.4 VALUTAZIONE DELL'EFFETTO GENOPROTETTIVO

Il danno al DNA è uno tra i più evidenti e significativi effetti cellulari indotti dallo stress ossidativo con conseguenze biologiche rilevanti e molteplici [235], e la sua sensibilità alla eventuale protezione da e-PC è stata valutata in cellule U937 mediante *Fast Halo Assay* (FHA). Nell'FHA i frammenti di DNA a singolo filamento diffondono radialmente rispetto alla regione nucleare in maniera direttamente proporzionale al danno indotto [229]. Determinando l'area dell'alone in rapporto a quella del suo nucleo, mediante programmi di analisi dell'immagine, è possibile valutare il danno al DNA: maggiore è l'alone, maggiore il rapporto alone/nucleo, maggiore è il danno. Gli esperimenti sono stati condotti sia con H₂O₂ (Figura 18-A) che con tBOOH (Figura 18-B), a concentrazioni tali da produrre un livello di danno di media intensità.

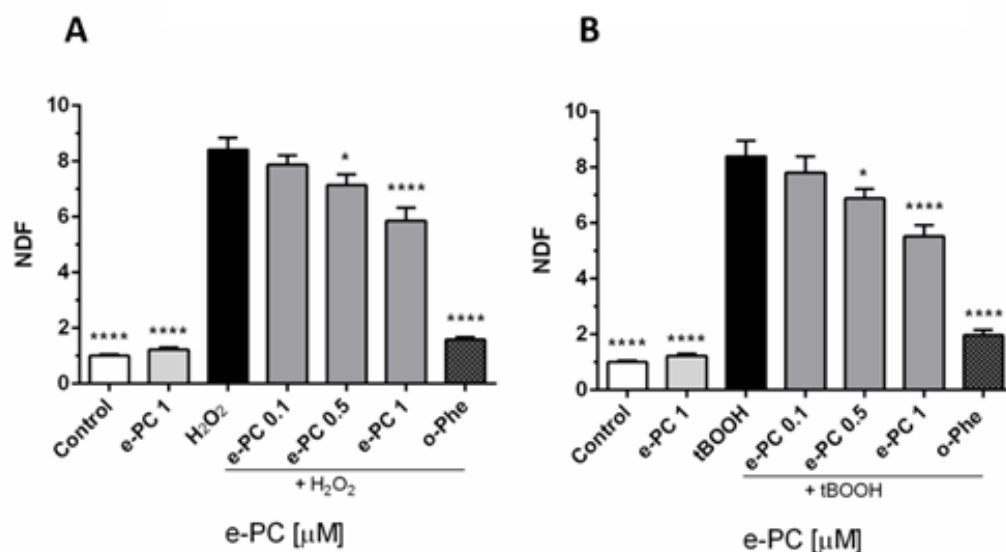


Figura 18. Effetto di e-PC sulla genotossicità indotta da H₂O₂ e tBOOH in cellule U937. Le U937 sono state incubate 3h con diverse concentrazioni di e-PC (da 0,1 a 1 μM) in RPMI senza siero, poi trattate per 1h con H₂O₂ 1mM (A) o con tBOOH 1 mM (B), in presenza di e-PC, in terreno senza siero. Al termine del trattamento è stato eseguito il FHA come indicato nella sezione materiali e metodi. o-Phe 10 μM è stata inclusa come controllo positivo. I dati sono espressi come Nuclear Diffusion Factor (NDF) e sono la media ± SEM di tre esperimenti indipendenti. Per l'analisi statistica è stato eseguito il test One-way Anova ed il post-test Dunnett. * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$ rispetto ai trattati con solo H₂O₂ o tBOOH.

Con entrambi gli ossidanti si osserva un significativo livello di danno al DNA, totalmente prevenibile dal chelante del ferro o-Phe usata come controllo positivo. Il trattamento con e-PC porta, sia nel caso di H₂O₂ che di tBOOH, ad una significativa diminuzione dose-dipendente del danno, anche se non completa come nel caso di o-Phe (e-PC 1 μM riduce del 31% il danno al DNA indotto dal H₂O₂ e del 35% quello indotto dal tBOOH vs rispettivamente l'81% ed il 77% dell'o-Phe).

4.5 VALUTAZIONE DELLA CAPACITÀ CHELANTE DEL FERRO

La capacità di chelare il ferro è alla base dell'inibizione della reazione di Fenton / Haber – Weiss (Reazioni 2, 3 e 3a del paragrafo 1.1) ed è uno dei possibili meccanismi di una parte degli antiossidanti per prevenire i danni causati dai ROS. La reazione di Fenton, in biologia cellulare è una parte della più complessa reazione di Haber-Weiss che catalizza la

formazione di $\cdot\text{HO}^-$ a partire da H_2O_2 e dal ferro mantenuto nello stato di ossidazione ridotta da $\cdot\text{O}_2^-$ [14, 15]. Per verificare la capacità chelante di e-PC abbiamo utilizzato la variazione subita dal suo spettro di assorbimento, in seguito ad aggiunta di concentrazioni crescenti di ferro. La maggiore componente di e-PC (PCA), presenta nella porzione ficobilinica anelli aromatici responsabili della colorazione fluorescente, che possono interagire con il ferro, inducendo dei cambiamenti nella scansione spettrofotometrica della stessa. Come evidenziato dalla figura 19, abbiamo confrontato la variazione di assorbimento di e-PC nel picco presente a 620 nm (dovuto alla PCA) con o senza FeCl_3 (Figura 19-A) e con o senza FeSO_4 (Figura 19-B).

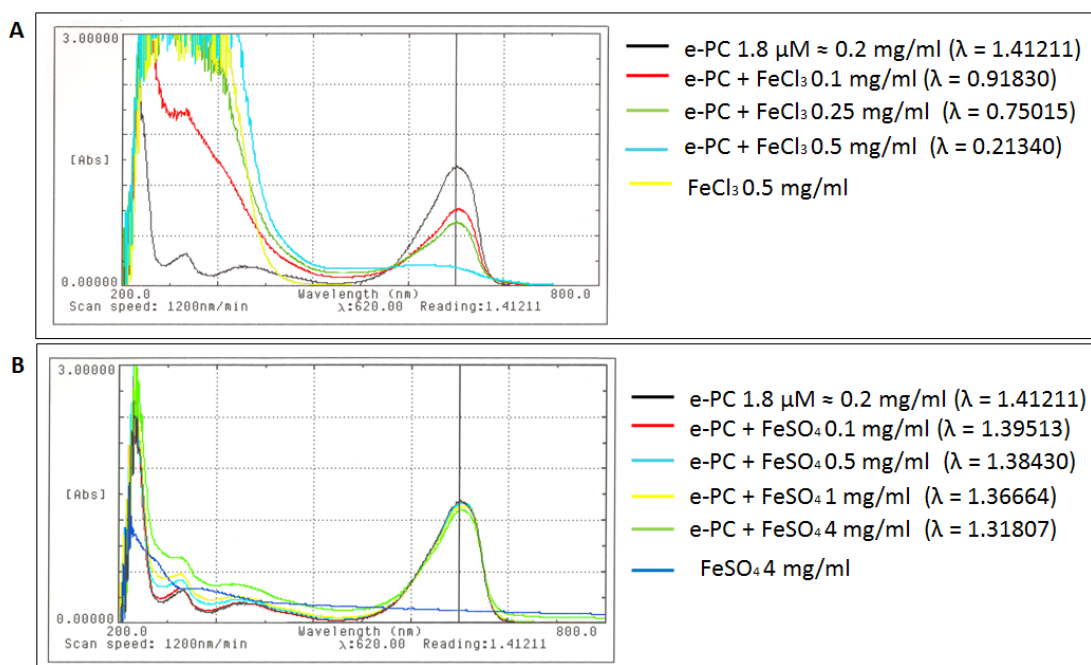


Figura 19 Valutazione della variazione dell'assorbanza di e-PC dopo aggiunta di Fe^{2+} o Fe^{3+} . (A) e-PC dopo aggiunta di diverse concentrazioni di Fe^{3+} . In nero e-PC da sola, in rosso e-PC+ Fe^{3+} 0,1mg/mL, in verde e-PC+ Fe^{3+} 0,25 mg/mL, in azzurro e-PC+ Fe^{3+} 0,5 mg/mL ed in giallo Fe^{3+} 0,5 mg/mL senza e-PC. (B) e-PC dopo aggiunta di diverse concentrazioni di Fe^{2+} . In nero e-PC da sola, in rosso e-PC+ Fe^{2+} 0,1 mg/mL, in azzurro e-PC+ Fe^{2+} 0,5 mg/mL, in giallo e-PC+ Fe^{2+} 1 mg/mL, in verde e-PC+ Fe^{2+} 4 mg/mL ed in blu Fe^{2+} 4 mg/mL senza e-PC.

Dai risultati è evidente che il picco di assorbanza a 620 nm caratteristico di e-PC diminuisce all'aumentare della concentrazione del ferro ferroso o ferrico e contemporaneamente si assiste ad una progressiva decolorazione di e-PC. Lo ione ferrico è più efficace e alla concentrazione di 0,5 mg/mL FeCl_3 è stata osservata la scomparsa del

picco a 620 nm e la totale decolorazione della soluzione. Complessivamente questi risultati ci portano ad ipotizzare che e-PC è in grado di interferire con la reazione di Haber – Weiss complessando il ferro.

4.6 MODULAZIONE DEI miR-146a E miR-126 IN UN MODELLO INFIAMMATORIO ENDOTELIALE

Nel nostro progetto, abbiamo valutato l'espressione genica dei miR-146a e miR-126 nonché di molecole loro collegate (IL-6, IRAK-1, ICAM-1 e VCAM-1, paragrafo 1.2.2) coinvolte nel processo infiammatorio nelle cellule HUVEC stimulate con LPS. (Figura 20).

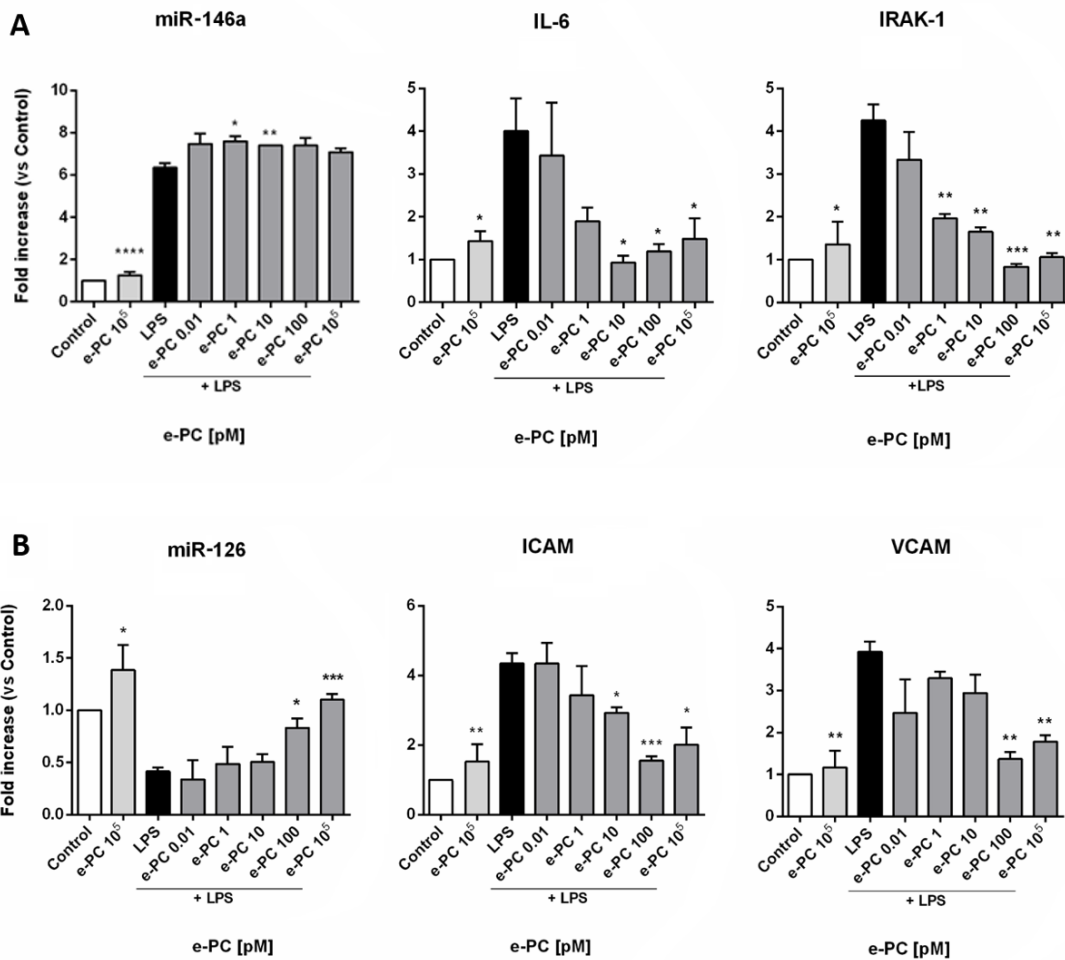


Figura 20. Effetto di e-PC sull'espressione di miR-146a, IL-6 ed IRAK-1 (A) miR-126, VCAM-1 ed ICAM-1 (B) su HUVEC esposte a stimolo infiammatorio. Le cellule sono state trattate con diverse concentrazioni di e-PC (da 0,01 a 10⁵ pM) per 24h, quindi stimolate con LPS (1 µg/mL) per le successive 6h. Al termine del trattamento l'espressione dei miRNA e degli mRNA è stata valutata come indicato nella sezione materiali e metodi. I dati sono espressi come variazione di espressione rispetto al controllo e sono la media ± SEM di tre esperimenti indipendenti. Per l'analisi statistica è stato eseguito il *t test*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ rispetto ai trattati con LPS

Brevemente, per quanto riguarda miR-146a esso viene indotto a seguito di stimolo infiammatorio innescando una risposta a *feedback* negativo che porta ad una ridotta espressione di IL-6 e IRAK-1; nel caso di miR-126, è noto che in condizioni infiammatorie la sua produzione è diminuita, il che si traduce in un aumento dell'espressione dei suoi *target* (ICAM-1 e VCAM-1). Secondo questo schema, variazioni positive o negative nell'espressione di miR-146a o di miR-126, rispettivamente, si traducono in un effetto che, limitatamente al nostro modello sperimentale, si può considerare anti- infiammatorio. Come evidente dalla figura 20-A, il trattamento con LPS induce un

aumento dell'espressione del miR-146a, un effetto che viene tendenzialmente potenziato da e-PC con una variazione statisticamente significativa alle dosi di 1 e 10 pM. Concordemente LPS aumenta l'espressione degli mRNA di IRAK-1 e di IL-6, effetto che viene prevenuto in maniera dose-dipendente da e-PC. Circa miR-126 (Figura 20-B) la stimolazione delle HUVEC con LPS ne riduce significativamente l'espressione, un effetto che viene prevenuto da e-PC in maniera dose-dipendente. Spostando l'attenzione sui suoi *target*, la loro espressione risulta significativamente ridotta, in maniera dose dipendente, in seguito al trattamento con e-PC. Da sottolineare, infine, come gli effetti di e-PC si manifestino a concentrazioni nel range picomolare, cioè estremamente basse.

4.7 MODULAZIONE DELL'ESPRESSIONE DELLA PROTEINA VCAM

Al fine di confermare ulteriormente i risultati molecolari precedentemente descritti, abbiamo quantificato la produzione della proteina VCAM-1 mediante saggio ELISA (Figura 21).

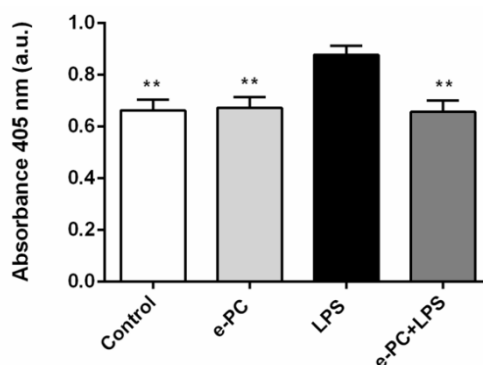


Figura 21. Analisi dell'espressione proteica di VCAM-1 mediante saggio ELISA. Le HUVEC sono state trattate per 24h con e-PC 10^5 pM, quindi stimolate con LPS per ulteriori 24h al termine del quale è stato eseguito il protocollo ELISA come descritto in materiali e metodi. I risultati sono espressi come la media \pm SEM di tre esperimenti indipendenti. Per l'analisi statistica è stato eseguito il test One-way Anova ed il post-test Dunnett ** $p < 0,01$ rispetto al trattati con solo LPS.

Concordemente ai dati illustrati nel paragrafo precedente, i risultati indicano che LPS induce la sintesi della proteina VCAM-1 e che e-PC è in grado di prevenire questa risposta. Inoltre, e-PC *per se* è inerte nei confronti dell'espressione proteica di VCAM-1.

4.8 VALUTAZIONE DEL LIVELLO DI ADESIVITÀ CELLULARE

La rilevanza sul piano funzionale degli effetti molecolari di e-PC descritti nel paragrafo 4.6 è stata studiata valutando l'effetto sull'adesività di cellule U937 su un monolayer di HUVEC stimulate con LPS, un modello *in vitro* che mima una delle fasi del reclutamento leucocitario sull'endotelio in condizioni infiammatorie (figura 4). In tal senso una minor capacità adesiva delle U937 alle HUVEC riflette la riduzione della reattività di queste ultime a stimoli infiammatori: la figura 22-B mostra delle microfotografie rappresentative del test. Come primo protocollo sperimentale le HUVEC sono state trattate con diverse concentrazioni di e-PC per 24h quindi stimulate con LPS (1 µg/mL) per le successive 6h (aggiunto ai terreni contenenti e-PC), al termine delle quali sono state aggiunte le U937 in co-coltura per 1h. I risultati ottenuti hanno dimostrato che il trattamento con LPS delle HUVEC è in grado di stimolare significativamente l'adesione delle U937; e-PC è in grado di ridurre questo fenomeno già a partire dalla concentrazione di 0,1 pM (Figura 22-A). Tale effetto aumenta progressivamente in maniera dose-dipendente fino alla concentrazione di e-PC 10 pM per poi andare a plateau. Per questo motivo i successivi saggi di adesività sono stati condotti con e-PC 10 pM (Figure 22-C e 22-D). Inoltre, i nostri risultati dimostrano che e-PC non ha nessuna capacità *per se* di stimolare l'adesività delle U937.

Successivamente abbiamo eseguito il saggio di adesività modificando le condizioni di incubazione delle HUVEC con e-PC, al fine di verificare se ciò portasse a dei cambiamenti nell'effetto descritto precedentemente: e-PC è stata aggiunta solo nella fase di pre-incubazione (le prime 24h), oppure nella fase di co-incubazione assieme all'LPS (solo le 6h di stimolo infiammatorio e l'ultima con le U937). Dai risultati è emerso che nella fase di co-incubazione e-PC è in grado di inibire l'adesione delle U937 tanto quanto riportato nel protocollo descritto precedentemente, mentre nella fase di pre-incubazione tale inibizione risulta ugualmente presente, seppure in grado significativamente minore rispetto agli altri due protocolli (Figura 22-C). Infine abbiamo voluto accertare se l'effetto

di inibizione dell'LPS precedentemente riscontrato fosse dovuto ad una modulazione di e-PC sulle HUVEC e non sulle U937. Quindi abbiamo pre-trattato le U937 per 15 min con e-PC prima di aggiungerle nell'ultima ora di trattamento alle HUVEC stimulate con LPS, ma non trattate con l'estratto. I risultati hanno evidenziato come e-PC non sia in grado di interferire sulle U937 durante il saggio di adesività. Infatti, le U937 pretrattate con e-PC aderiscono alle HUVEC in maniera analoga rispetto alla condizione con solo LPS (Figura 22-C).

Per concludere questa serie di analisi abbiamo verificato se l'introduzione di un periodo di recovery tra la fase di pre-incubazione e lo stimolo infiammatorio potesse influire sull'effetto evidenziato nella figura 22-C (e-PC pre-incubazione). Pertanto, le HUVEC sono state trattate come precedentemente descritto per la fase di pre-incubazione, ma prima del successivo stimolo con LPS è stata eseguita un'incubazione intermedia (da 5 a 90 min) con terreno fresco senza e-PC. Le figure 22-D e 22-E mostrano come all'aumentare del tempo di recovery l'effetto inibitorio di e-PC diminuisca in maniera inversamente proporzionale, fino a scomparire totalmente dopo i 90 min.

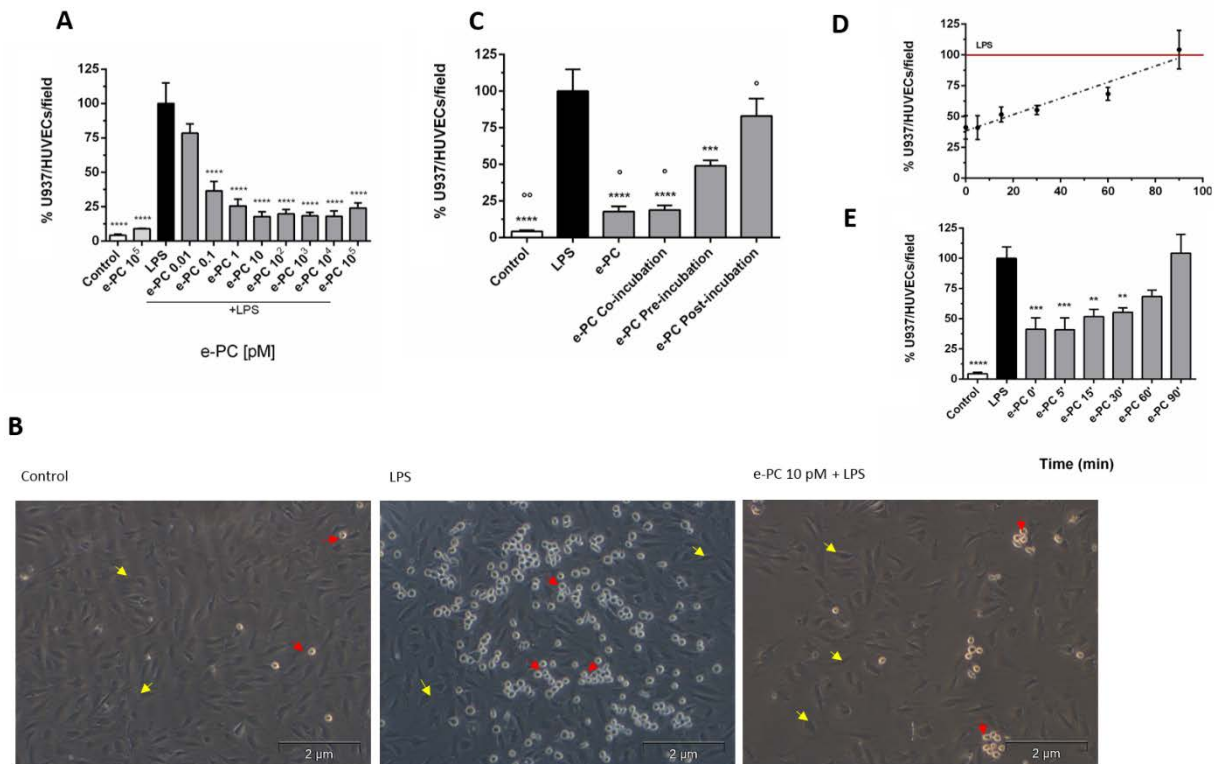


Figura 22. Effetto di e-PC sull'adesione delle U937 sulle HUVEC stimulate da LPS. (A) Le HUVEC sono state trattate con diverse concentrazioni di e-PC (da 0,01 a 10⁵ pM) per 24h, quindi stimulate con LPS (1µg/mL) per ulteriori 6h (in presenza di e-PC) al termine delle quali sono state aggiunte in co-incubazione le U937 per 1h. Al termine del trattamento il test di adesività è stato eseguito come indicato nella sezione materiali e metodi. (B) Le immagini dell'adesione delle U937 alle HUVEC sono state acquisite utilizzando il microscopio ottico rovesciato Olympus CKX41 (obiettivo 10x). Le frecce in rosso indicano le U937, mentre quelle in giallo indicano le HUVEC. (C) Le HUVEC sono state trattate con e-PC 10 pM per differenti tempi, per come indicato nel testo. Successivamente sono state trattate con LPS (1 µg/mL) in presenza o meno di e-PC, quindi trattate secondo il saggio di adesività. (D-E) Le HUVEC sono state pre-trattate per 24h con e-PC 10 pM, quindi lavate e lasciate recuperare in terreno fresco per diversi tempi (da 5 a 90 min) e successivamente stimulate con LPS (1 µg/mL) in assenza di e-PC per 6h. Quindi è stato eseguito il protocollo di adesività. In (D) i risultati sono rappresentati mediante regressione lineare, mentre in (E) mediante grafico a barre. I risultati sono espressi come la media ± SEM di sette esperimenti indipendenti per la sezione D e di 8 esperimenti indipendenti per le sezioni A e C. Per l'analisi statistica è stato eseguito il test One-way Anova ed il post-test Dunnett. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ rispetto al trattati con solo LPS, mentre ° $p < 0,05$; °° $p < 0,01$ rispetto al trattato e-PC pre-incubazione.

4.9 VALUTAZIONE DEL DIAMETRO DEI MIOTUBI ESPOSTI AD LPS ED e-PC

L'infiammazione è una delle cause che possono portare alla perdita di massa muscolare, che si manifesta mediante una diminuzione dello spessore delle fibre muscolari e che spesso esita in atrofia muscolare [236]. Uno studio recente ha evidenziato come l'LPS sia un potente modulatore del TLR-4 e come esso riduca la sintesi proteica nei muscoli di suini appena nati [128]. Inoltre l'LPS è in grado di ridurre la sintesi proteica in un sistema *in vitro* di mioblasti murini (C2C12) e, mediante attivazione del TLR-4, innescare una serie di risposte infiammatorie come quelle sostenute da citochine pro-infiammatorie responsabili dell'induzione del catabolismo muscolare [127, 130, 131].

Abbiamo pertanto valutato dapprima la risposta dei miotubi (ottenuti dal differenziamento delle C2C12) in seguito ad attivazione del TLR-4 da LPS, e successivamente l'effetto di e-PC su tale risposta. In accordo con i dati già presenti in letteratura [129, 237], nel nostro modello sperimentale il trattamento con LPS (1 µg/mL) riduce significativamente il diametro dei miotubi rispetto al controllo, in linea con l'effetto atrofizzante degli stimoli infiammatori. Invece, il trattamento con e-PC, che di per se non influenza il diametro dei miotubi, è in grado di prevenire tale effetto infiammatorio indotto da LPS in maniera significativa (Figura 23-B).

Questo aspetto è stato ulteriormente valutato misurando l'espressione della MyHC, un marcatore tardivo del differenziamento miogenico delle C2C12. Attraverso l'analisi *western blot* dei miotubi al DifD6 è stato possibile confermare, anche mediante valutazione biochimica, che e-PC previene l'effetto atrofico indotto dall'LPS (Figura 23-C).

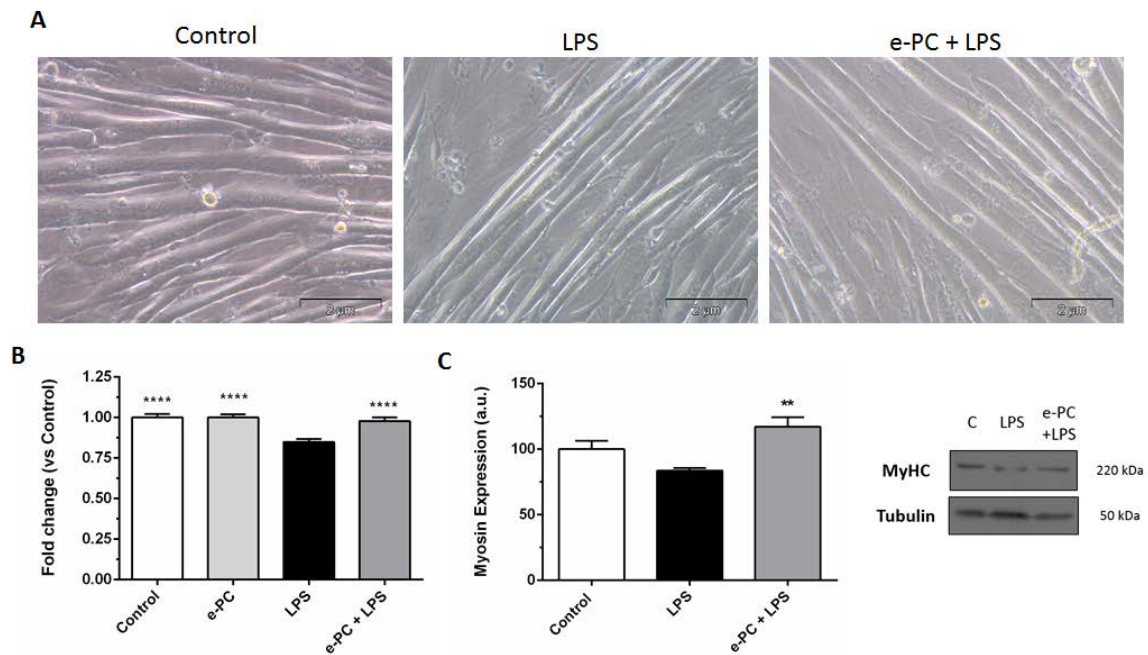


Figura 23. Effetto di e-PC sulla riduzione del diametro dei miotubi indotta da LPS. (A) Le immagini dei miotubi sono state acquisite utilizzando il microscopio ottico rovesciato Olympus CKX41 (obiettivo 20x). (B) I miotubi (DifD4) sono stati trattati per 48h con LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in presenza o meno di e-PC (10 nM), aggiunta 30' prima della stimolazione. Al termine del trattamento (DifD6) è stato misurato il diametro dei miotubi. I dati sono espressi come variazione rispetto al controllo e sono ottenuti dalla media \pm SEM di sette esperimenti indipendenti. (C) Nei miotubi (DifD6) trattati come descritto in precedenza, è stata valutata l'espressione di MyHC. I dati sono ottenuti dalla media di tre esperimenti indipendenti. È stato eseguito il test statistico One-way ANOVA ed il post-test Dunnett ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ rispetto ai trattati con solo LPS.

4.10 ESPRESSIONE DI miR-146a IN MIOTUBI ESPOSTI AD LPS ED e-PC

In accordo con alcuni studi che indicano che l'espressione del miR-146a risulta modulata nelle cellule muscolari esposte ad LPS, ed il suo coinvolgimento nel differenziamento muscolare [238, 239], visto il ruolo di tale miRNA nel processo infiammatorio, e visti gli effetti anti-infiammatori di e-PC riscontrati nel nostro lavoro (sia nelle HUVEC che nelle C2C12), abbiamo voluto verificare se e-PC fosse in grado di indurre una modulazione dell'espressione del miR-146a in miotubi maturi esposti a LPS. Come evidente dalla figura 24, e-PC è in grado di ridurre in maniera significativa l'elevata espressione del miR-146a indotta dall'LPS.

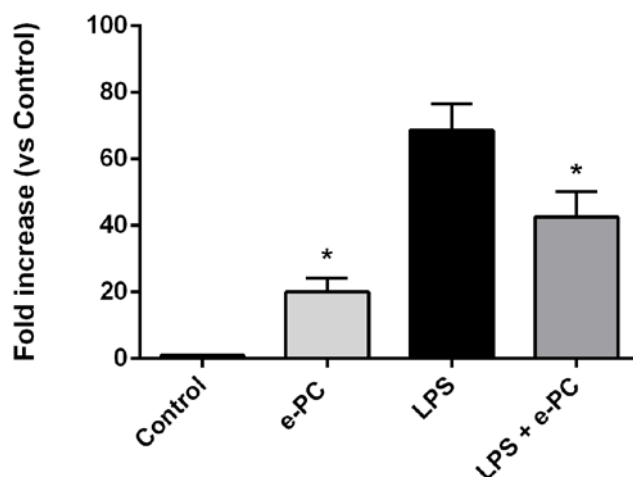


Figura 24. Effetto di e-PC sull'espressione di miR-146a su miotubi esposti a stimolo infiammatorio. I miotubi sono stati trattati per 48h con LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in presenza o meno di e-PC (10 nM), aggiunta 30' prima della stimolazione. Al termine del trattamento sono stati raccolti i corpi cellulari e l'espressione dei miRNA è stata valutata come indicato nella sezione materiali e metodi. I dati sono espressi come variazione di espressione rispetto al controllo ed espressi come media \pm SEM di tre esperimenti indipendenti. Per l'analisi statistica è stato eseguito il *t test*. * $p < 0,05$ rispetto al trattato con LPS

4.11 EFFETTO DI e-PC SULLA MIGRAZIONE CELLULARE INDOTTA DA LPS

Per verificare l'effetto di e-PC sulla migrazione cellulare indotta da LPS nelle cellule HUVEC e nelle C2C12, abbiamo utilizzato il saggio di migrazione cellulare. Le figure 25 e 26 indicano rispettivamente come l'LPS sia in grado di incrementare, in maniera tempo dipendente, la migrazione delle HUVEC e delle C2C12, rispetto alla condizione di controllo. Per contro, il trattamento con e-PC porta ad una diminuzione, in maniera dose-dipendente ed in entrambi i sistemi cellulari, di tale migrazione.

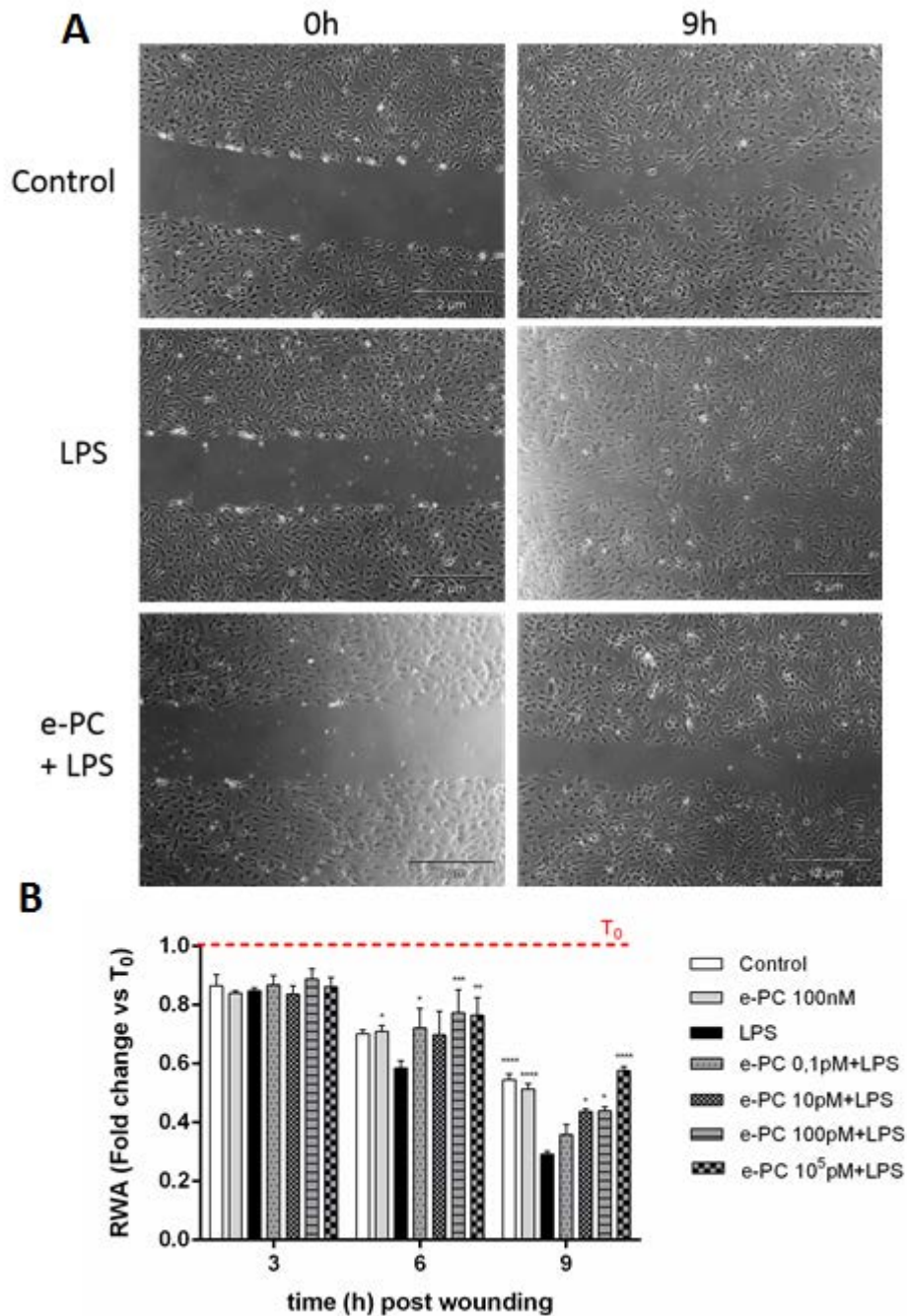


Figura 25. Effetto di e-PC sulla migrazione di HUVEC indotta da LPS. (A) Le immagini delle cellule HUVEC, acquisite utilizzando il microscopio ottico rovesciato Olympus CKX41 (obiettivo 4x), appena dopo il taglio e dopo 9h. (B) Le HUVEC sono state trattate per 24h con e-PC a differenti concentrazioni (da 0,1 a 10^5 pM). Successivamente sono state tagliate ed esposte ad LPS ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) in presenza o meno di e-PC (da 0,1 a 10^5 pM). I dati, ottenuti dalla media \pm SEM di 3 esperimenti indipendenti, sono espressi come variazione dell'area della ferita rimanente rispetto alla relativa condizione al T_0 (appena dopo il taglio). Per l'analisi è stato eseguito il test Two-way ANOVA ed il post-test Dunnett. **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ rispetto ai trattati con LPS.

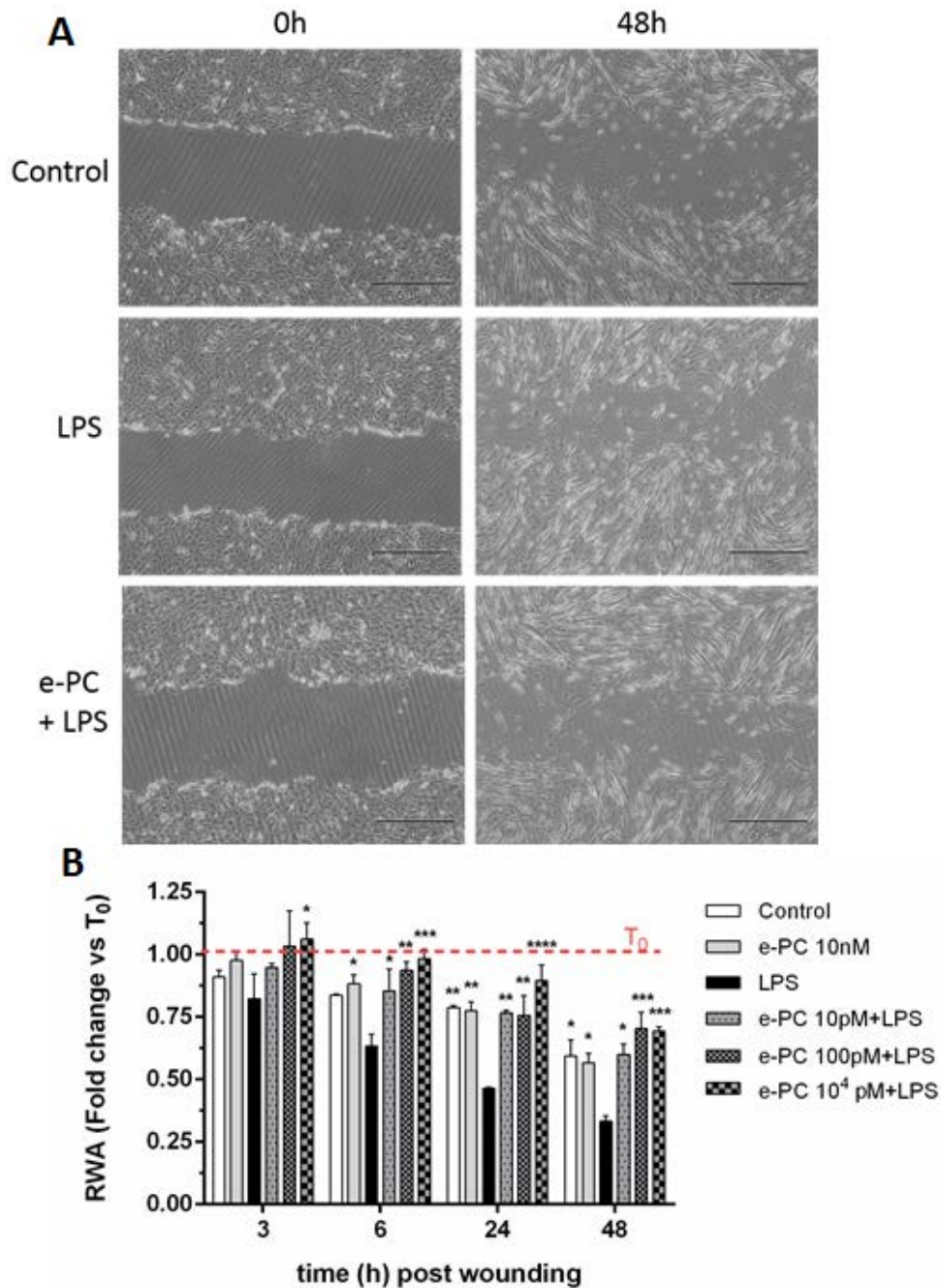


Figura 26. Effetto di e-PC sulla migrazione di C2C12 indotta da LPS. (A) Le immagini delle cellule C2C12, acquisite utilizzando il microscopio ottico rovesciato Olympus CKX41 (obiettivo 4x), appena dopo il taglio e dopo 48h. (B) Le C2C12 sono state trattate per 24h con e-PC a differenti concentrazioni (da 10 a 10^4 pM). Successivamente sono state tagliate ed esposte ad LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in presenza o meno di e-PC (da 10 a 10^4 pM). I dati, ottenuti dalla media \pm SEM di 3 esperimenti indipendenti, sono espressi come variazione dell'area della ferita rimanente rispetto alla relativa condizione al T_0 (appena dopo il taglio). Per l'analisi è stato eseguito il test Two-way ANOVA ed il post-test Dunnett **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ rispetto ai trattati con LPS.

5. DISCUSSIONE

Negli ultimi anni è sempre più in espansione l'utilizzo di integratori alimentari o cibi funzionali che vantano svariate proprietà benefiche per l'organismo umano. Così, via via si è andato affermando il concetto di nutraceutica, concetto fondato da DeFelice nel 1989 riferendosi ad un nutraceutico come ad un "alimento o parti di alimento che forniscono benefici per la salute umana e/o dal punto di vista medico, nella prevenzione e nel trattamento di patologie" [52]. *Aphanizomenon flos-aquae* Ralfs Ex Born. & Flah. Var. *flos aquae* (AFA), comunemente nota come *Klamath* è una microalga edibile appartenente al phylum dei cianobatteri il cui uso come supplemento nutrizionale è fortemente aumentato negli ultimi anni, sebbene già esistente in antiche popolazioni [169]. Nel nostro progetto abbiamo concentrato l'attenzione su una particolare componente di AFA. Essa infatti risulta essere ricca in PCA, pigmento fotosintetico legato covalentemente a gruppi cromofori (ficobiline) che ne conferiscono la colorazione blu. Alle PC sono già attribuite dalla letteratura importanti attività biologiche. Tuttavia solo in pochi casi ci si riferisce alla PCA [176, 177, 187, 188, 191, 192], e tra questi solo in alcuni sono stati utilizzati dei sistemi cellulari *in vitro* per studiarne gli effetti. Quindi, nel nostro progetto di ricerca abbiamo voluto verificare per la prima volta gli effetti citoprotettivi di un estratto acquoso di AFA ricco in PCA (chiamato e-PC) su un modello cellulare *in vitro* di muscolo scheletrico esposto a stress ossidativo, testandone gli effetti anche sul processo di differenziamento muscolare. I ROS, infatti, ricoprono un ruolo fondamentale nel muscolo scheletrico e sebbene siano costantemente prodotti dalla catena di respirazione mitocondriale e la loro produzione incrementata in maniera fisiologica con l'esercizio fisico, una loro non corretta detossificazione è responsabile della perossidazione lipidica, danno al DNA e danno proteico, che possono evolvere in squilibri nella proliferazione e nel differenziamento muscolare correlati con situazioni patologiche più o meno gravi [125, 126, 240, 241].

Il nostro primo obiettivo è stato quello di ottenere un estratto standardizzato, riproducibile e stabile che avesse un elevato contenuto in PCA. Seguendo la metodica di Benedetti et al. [193] con qualche modifica, abbiamo ottenuto un estratto altamente ricco in PCA, tale da poter essere considerato puro. Il profilo tossicologico di e-PC è stato

caratterizzato specificamente nei mioblasti C2C12, che ha evidenziato l'innocuità di dosi inferiori a 1 $\mu\text{M}/24\text{h}$; nelle U937 e nelle HUVEC sono stati ottenuti dati analoghi.

La valutazione dell'effetto citoprotettivo di e-PC nei confronti di H_2O_2 e tBOOH utilizzati come modelli di stress ossidativo acuto ha evidenziato una discreta attività per entrambi i perossidi, maggiore nel caso di tBOOH. Tale effetto antiossidante è stato confermato sia nelle U937 (Figura 14), che nei modelli cellulari miogenici ed endoteliali oggetto di studio (Figure 15, 16 e 17), indicando l'indipendenza del fenomeno dal tipo cellulare considerato.

I nostri risultati indicano anche che e-PC è efficace se somministrato a lungo prima del, o se presente durante il, periodo di esposizione agli ossidanti. Per contro, l'aggiunta di e-PC solo nella fase successiva al trattamento ossidativo risulta incapace di fornire alcuna attività (Figura 14), il che indica che l'effetto è legato alla prevenzione/blocco della produzione dei danni e non ad una migliore capacità di rimuoverli.

Per quanto riguarda le C2C12 in differenziamento, dove è stato utilizzato il saggio dell'MTT, oltre a confermare l'attività citoprotettiva di e-PC anche in questo modello (Figura 16), i risultati indicano che e-PC non è in grado *per se* di incrementare l'attività mitocondriale, sulla quale si basa il saggio MTT, suggerendo sebbene solo indirettamente, che e-PC non è in grado di indurre effetti trofici sulle cellule miogeniche. A questo proposito esperimenti non descritti in questa tesi hanno dimostrato che l'effetto citoprotettivo di e-PC non è accompagnato dalla capacità di ripristinare il pieno potenziale miogenico delle C2C12 stressate ossidativamente, fornendo una risposta negativa a uno degli obiettivi che ci eravamo prefissi di investigare in questa ricerca.

Circa il meccanismo alla base dell'effetto antiossidante, i dati illustrati nella figura 19 indicano che e-PC agisce non con un meccanismo *radical scavenging*, ma piuttosto chelando il ferro, una proprietà in grado di bloccare la produzione dei radicali altrimenti generati dalla reazione di Haber–Weiss.

Nella stessa direzione vanno i risultati di danno al DNA ottenuti con il FHA (Figura 18), in cui e-PC inibisce in maniera dose-dipendente, seppure parzialmente rispetto all'o-Phe, il danno nucleare indotto alle U937 da H_2O_2 e da tBOOH: è infatti noto che solo i chelanti del ferro, a differenza degli antiossidanti di tipo *scavenger*, sono in grado di prevenire il danno al DNA indotto da H_2O_2 e tBOOH somministrati in acuto [242]. L'effetto genoprotettivo di e-PC presuppone inoltre una certa capacità di permeare la membrana

cellulare, almeno in parte, interferendo con la produzione intracellulare di radicali: il fatto che o-Phe sia più attiva di e-PC potrebbe suggerire che quest'ultima, probabilmente a causa del suo elevato peso molecolare non riesce a raggiungere il compartimento intracellulare in modo quantitativo. In tal senso, la scarsa quantità di letteratura presente, non ci ha fornito ulteriori informazioni circa il suo meccanismo di assorbimento e/o internalizzazione cellulare, impedendoci di avere una visione più completa a riguardo.

Un aspetto centrale che abbiamo voluto investigare in questa tesi è che lo stress ossidativo innesca e/o partecipa ad un ampio numero di risposte e percorsi fisiopatologici, come lo squilibrio differenziativo delle cellule progenitrici (quali ad esempio i mioblasti), meccanismi apoptotici e/o infiammatori, in quasi tutti i tipi di cellule e tessuti [21, 23, 25, 115-117, 123]. In particolare, l'infiammazione è coinvolta in una pletora di malattie tra cui le miopatie [124-126, 236]. Così, un altro obiettivo di questo progetto è stato quello di indagare la capacità di e-PC nel modulare parametri molecolari e funzionali indicativi di reazione infiammatoria nei sistemi cellulari appena descritti: dapprima sulle cellule HUVEC e quindi sui miotubi, entrambi stimolati con LPS. Per quanto riguarda le HUVEC, abbiamo analizzato l'espressione di particolari miRNA: il miR-146a ed il miR-126. I miRNA, sono piccoli frammenti di RNA non codificante capaci di interferire con l'espressione genica [78] di molecole loro collegate coinvolte nel meccanismo infiammatorio (IL-6, IRAK-1, ICAM-1 e VCAM-1, paragrafo 1.2.2)

Dai nostri risultati (Figura 20-A) l'espressione del miR-146a, in accordo con i dati presenti in letteratura, risulta incrementata in seguito allo stimolo con LPS, a riprova dell'attivazione del TLR-4. Un'ulteriore conferma dell'attivazione del *pathway* del TLR-4, nel nostro modello sperimentale è data dall'aumento dell'espressione di IRAK-1 e di IL-6 a seguito dello stimolo con LPS. Per contro, e-PC sembrerebbe in grado di interferire con questi fenomeni: infatti sia l'espressione di IRAK-1 che di IL-6 è ridotta in maniera dose-dipendente in seguito al trattamento con e-PC, mentre l'espressione di miR-146a rimane elevata, tendenzialmente incrementata, dopo esposizione a e-PC. Questi effetti sono compatibili con le modalità di intervento di miR-146a in questo *pathway*: infatti il miR-146a, la cui espressione è indotta da NF- κ B, è in grado di regolare l'espressione di IRAK-1, inibendola per mezzo di un meccanismo a *feedback* negativo che sta alla base di un fenomeno adattativo anti-infiammatorio. Pertanto l'incrementata espressione di miR-146a che si osserva con e-PC si traduce in un'ulteriore diminuzione dell'espressione di

IRAK-1 (a monte della via attivata da TLR-4) e di conseguenza di IL-6 (a valle della via del TLR-4). Riassumendo è quindi plausibile che l'elevata espressione di miR-146a (figura 20-A), evidenziata a seguito del trattamento con e-PC, inneschi proprio questo *feedback* negativo.

Per quanto riguarda il miR-126, la sua espressione è fortemente ridotta dopo trattamento con LPS (Figura 20-B), calo che risulta essere prevenuto, in maniera dose-dipendente, da e-PC, la cui attività si registra già a concentrazioni veramente basse per poi raggiungere un plateau a 10^5 pM. Tale effetto è in linea con i risultati ottenuti sulla modulazione dell'espressione degli mRNA dei suoi *target* ICAM-1 e VCAM-1, e della quantificazione della proteina VCAM-1 (Figura 21).

Per approfondire l'importante l'effetto anti-infiammatorio dimostrato da e-PC, e poiché ICAM-1 e VCAM-1 sono coinvolte, insieme ad altre molecole di adesione nel processo di reclutamento leucocitario, abbiamo eseguito un saggio di adesione endoteliale in un contesto *in vitro* che mima una delle fasi del reclutamento leucocitario sull'endotelio in condizioni infiammatorie (figura 4). Complessivamente e-PC ha dimostrato di inibire in maniera altamente significativa ed in maniera dose-dipendente l'adesività delle U937 alle HUVEC, fino a raggiungere un plateau d'effetto a 10 pM (Figura 22-A-C e D). E' importante notare che queste concentrazioni sono le stesse risultate efficaci nei saggi molecolari. Inoltre i risultati indicano che l'effetto di e-PC è massimo quando l'estratto è presente insieme ad LPS (co-incubazione), si riduce nella pre-incubazione (e-PC prima di LPS), e ritorna ai valori ottenuti durante la co-incubazione se l'estratto è presente in ogni fase dell'esperimento (pre- + co-incubazione). Questi dati, assieme ad altri disegnati specificamente¹, hanno anche dimostrato che l'effetto di e-PC è dovuto alla prevenzione della reattività delle HUVEC nei confronti dell'LPS, e non piuttosto ad un qualche effetto sulle U937 (Figura 22-C). Inoltre, fra ponendo periodi di recovery crescenti in assenza di e-PC, prima di stimolare le HUVEC con LPS, nel trattamento in cui e-PC è stata usata in pre-incubazione, abbiamo riscontrato una relativa rapidità nella reversibilità dell'effetto (Figura 22-D). Dopo 90 min di recovery l'effetto di inibizione dell'adesività risulta essere completamente annullato. Ciò fa ipotizzare che e-PC potrebbe agire mediante un

¹ Le cellule U937 sono state pretrattate per 15 minuti con e-PC prima di aggiungerle nell'ultima ora di trattamento a colture di HUVEC stimulate con LPS, ma non trattate con l'estratto: in queste condizioni non c'è stata differenza tra il livello di adesione delle U937 pretrattate o meno con e-PC (Figura 22-C).

meccanismo di antagonismo competitivo e/o inibizione allosterica con TLR-4 in grado di ridurre il legame con LPS attenuandone gli effetti fino alla dissociazione del complesso col recettore stesso. Questo tipo di interazione potrebbe avvenire senz'altro sull'interfaccia della membrana extracellulare. Non possiamo escludere allo stato attuale che e-PC, invece, interagisca dal lato intracellulare con TLR-4 o con elementi downstream: in questo caso la rapida reversibilità potrebbe derivare da un altrettanto rapido attraversamento di e-PC della membrana plasmatica per gradiente passivo. Tuttavia la probabile limitata capacità di e-PC di attraversare le membrane plasmatiche a causa delle sue elevate dimensioni molecolari rendono la prima ipotesi più plausibile. Le differenze nell'attività antiossidante di e-PC riscontrate tra i protocolli "pre" "pre + co" e "post" non aiutano a tracciare un quadro farmacocinetico più completo perché i meccanismi di interazione con TLR-4 da un lato e i ROS dall'altro potrebbero verificarsi in compartimenti diversi della cellula, ovvero intra- ed extracellularmente.

Quindi l'effetto riscontrato nel saggio di adesività, evidente addirittura a concentrazioni più basse, conferma i risultati dalle analisi molecolari e rafforza l'indicazione che e-PC possiede un singolare potenziale anti-infiammatorio.

Forti di questi risultati, siamo quindi passati a verificare se e-PC, così come nelle HUVEC, potesse ridurre effetti funzionali deleteri dell'LPS anche sui miotubi differenziati.

L'infiammazione è una delle cause che possono portare alla perdita di massa muscolare che si manifesta mediante una diminuzione dello spessore delle fibre muscolari, che spesso si traduce in atrofia muscolare [236]. L'LPS è in grado di ridurre la sintesi proteica in un sistema *in vitro* di C2C12 e, mediante attivazione del TLR-4, innescare una serie di risposte infiammatorie come il rilascio di citochine pro-infiammatorie responsabili dell'induzione del catabolismo muscolare [127, 130, 131]. Quindi in un primo momento abbiamo verificato se e-PC fosse in grado di inibire la riduzione del diametro dei miotubi maturi indotta da LPS, e siamo poi passati, nello stesso modello cellulare, a verificare la modulazione dell'espressione di miR-146a.

Dai nostri risultati è emerso che e-PC previene in maniera significativa la riduzione del diametro dei miotubi maturi indotta da LPS (Figura 23). Tale risultato è stato verificato non solo mediante l'analisi morfologica dei miotubi, ma anche mediante *western blot*, dimostrando che e-PC previene la diminuzione della miosina indotta dall'LPS.

Per quanto riguarda l'espressione del miR-146a nei miotubi maturi (Figura 24), questa è significativamente aumentata dopo lo stimolo con LPS, in accordo a quanto verificato anche nel modello endoteliale (Figura 21). Il trattamento con e-PC tuttavia ha portato nel modello sperimentale utilizzato, ad una riduzione dell'espressione del miR-146a, (Figura 24). Tale risultato, apparentemente in contrasto con la modulazione del miR-146a riscontrata nelle HUVEC², è probabilmente legato alla cinetica dell'espressione di miR-146a che non siamo stati in grado di determinare esaminando anche tempi più precoci. Mentre scriviamo sono in corso esperimenti specifici. Il dato che qui riportiamo, ad ogni modo, può riflettere il fatto che dopo 48h le C2C12 trattate con e-PC si trovano in uno stato di reattività infiammatoria comunque inferiore a quelle esposte solo a LPS, e quindi converge indirettamente nella direzione di riconoscere a e-PC un importante effetto anti-infiammatorio anche in questo sistema cellulare.

Un aspetto importante nel bilancio infiammazione/riparazione in cui vi è l'attivazione di TLR-4, è la promozione della migrazione delle cellule endoteliali, importante nella guarigione delle ferite, migrazione che estratti e/o molecole ad attività anti-infiammatoria in certe condizioni inibiscono [234, 243]. Recentemente, Chen et al. [244], hanno evidenziato come l'espressione del TLR-4 aumenta nella prima fase della guarigione delle ferite in un sistema *in vitro* di epitelio murino, mentre in un sistema *in vivo* (topi TLR-4-knowout), tale riparazione avviene con ritardo. Eslani et al. [245], hanno dimostrato che TLR-4 attivato da LPS induce la migrazione cellulare, mentre CLI-095 agendo da inibitore intracellulare del TLR-4 è in grado di inibire tale effetto. Tutto ciò suggerisce che TLR-4 riveste un ruolo importante nel processo di migrazione cellulare a monte della riparazione delle ferite.

In questo contesto abbiamo verificato che LPS stimola e accelera la migrazione sia delle cellule HUVEC sia delle C2C12 in seguito ad una ferita meccanica e che, in accordo alla visione che emerge da questo studio, e-PC è in grado di inibire tale effetto in maniera dose dipendente (Figure 25 e 26). Tali dati forniscono ulteriore conferma del fatto che l'effetto anti-infiammatorio di e-PC correla con l'attività di inibizione del recettore TLR-4;

² LPS è noto per indurre danno biologico nelle cellule muscolari, attivando il TLR4. È noto che miR146a è sovra espresso in seguito a stimolazioni con LPS nelle cellule muscolari. Tuttavia non è chiaro se l'espressione di questo miRNA nelle cellule muscolari risponda al meccanismo di feedback negativo, in quanto tali cellule non rientrano come le cellule endoteliali, nel sistema dell'immunità innata, principalmente coinvolta nel meccanismo infiammatorio. Esperimenti cinetici aiuteranno a comprendere meglio questo problema.

l'effetto di e-PC è inoltre paragonabile a quello ottenuto in un analogo modello sperimentale utilizzando un inibitore allosterico di TLR-4, il CLI-095, il che potrebbe suggerire, per similitudine, che anche e-PC inibisca TLR-4 in maniera allosterica.

Va però detto che, in un contesto più generale, il ruolo di TLR-4 e dell'infiammazione nella rimarginazione delle ferite, risulta ancora dibattuto e controverso. Infatti è stato dimostrato che l'attivazione prolungata di TLR-4 come nella stimolazione infiammatoria perdurante o cronica (es. ulcere croniche venose) innesca modificazioni tali da rallentare, anziché accelerare, la guarigione delle ferite [246, 247]. Pertanto nel caso di infiammazione cronica, la sua riduzione comporta un effetto benefico in termini di capacità di rimarginazione e riparazione delle ferite.

Infine, in uno studio di Ravi et al. su cellule tumorali [221] sono state evidenziate le proprietà anti-angiogeniche di un estratto contenente PCS, proprietà ricondotte alla capacità di inibire la migrazione cellulare. Pertanto gli effetti indotti da e-PC sulla migrazione cellulare nei nostri modelli sperimentali unitamente a quelli che dimostrano il forte effetto anti-infiammatorio dell'estratto, possono aprire la strada allo studio di importanti potenzialità farmacologiche di e-PC ancora poco e per nulla indagate.

6. CONCLUSIONI

Dai risultati qui esposti è emerso che e-PC possiede una complessivamente discreta attività antiossidante, indipendente dal tipo cellulare e più marcata nei confronti del tBOOH, un modello di perossido organico. L'attività antiossidante è in linea con i dati presenti in letteratura, anche se questi ultimi sono per lo più riferiti a sistemi acellulari dove si è osservata una maggiore potenza di e-PC. La differente potenza antiossidante di e-PC tra i sistemi cellulari e acellulari potrebbe dipendere dalla sua effettiva capacità di penetrare le membrane cellulari, molto probabilmente scarsa viste le elevate dimensioni molecolari. Questo è un aspetto che, come si discuterà poco più avanti, deve ancora essere chiarito e che merita attenzione.

Più rilevante è stata l'individuazione di effetti su specifici fattori pro-infiammatori attivati dal *pathway* di TLR-4 e su alcune risposte funzionali rappresentative di reazione infiammatoria su scala cellulare, sia nelle colture endoteliali che miogeniche. Molto interessante il fatto che questi effetti potenzialmente predittivi di una spiccata attività anti-infiammatoria di e-PC *in vivo* si manifestano a concentrazioni molto basse (nell'ordine della picomolarità) e notevolmente inferiori rispetto a quelle con evidente effetto citoprotettivo. Quest'ultima osservazione, se ce ne fosse ulteriore necessità, indica chiaramente che e-PC agisce su questo *pathway* pro-infiammatorio con meccanismi indipendenti da quelli coinvolti nello stress ossidativo.

Questa coesistenza di meccanismi separati ma finalisticamente convergenti (attività anti-infiammatoria e citoprotettiva/antiossidante) è senz'altro in linea con il pleiotropismo comune a molte molecole attive di derivazione vegetale.

Sulla base dei nostri risultati, il meccanismo d'azione anti-infiammatoria più plausibile sembrerebbe essere dovuto per ad un'azione sulla membrana, piuttosto che intracellularmente sulle tappe a valle di TLR-4. In particolare le diverse modalità di incubazione con e-PC nel modello infiammatorio endoteliale possono suggerire che e-PC interagisca direttamente con TLR-4, antagonizzando in modo competitivo il legame con LPS o regolandolo in modo allosterico, ma in ogni caso in modo reversibile. Ciò sarebbe compatibile con una interazione sul lato extracellulare della membrana, chiaramente più accessibile ad una molecola caratterizzata da notevoli dimensioni. Tuttavia i dati

dell'attività antiossidante indicano che e-PC supera, almeno in parte, la membrana cellulare. Quindi i due effetti -antiossidante e anti-infiammatorio- potrebbero essere slegati sia in termini di potenza che di localizzazione.

E' ancor più chiara a questo punto, nella prospettiva di sfruttare una attività sistemica di e-PC, la necessità di determinare da un punto di vista quantitativo l'aspetto farmacocinetico a partire dalla scala cellulare. Anche in mancanza di ciò, tuttavia, gli effetti di e-PC che abbiamo messo in luce potrebbero essere già meritevoli di valutazione in condizioni patologiche localizzate in compartimenti facilmente accessibili dall'esterno e suscettibili di applicazioni topiche: tra queste le ustioni, le patologie infiammatorie dermatologiche nonché le infiammazioni croniche intestinali, come ad esempio il morbo di Crohn. In campo muscolo-scheletrico gli aspetti farmacocinetici, qui più limitanti, potrebbero essere superati mettendo a punto formulazioni topiche specifiche (ad es. ialurosomi, liposomi, nanovettori) o con l'ausilio di sistemi fisici di veicolazione transdermica (ionoforesi, ultrasuoni e simili).

BIBLIOGRAFIA

1. Cooke, M.S., et al., *Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease*. The FASEB Journal, 2003. **17**(10): p. 1195-1214.
2. Lushchak, V.I., *Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification*. Chemico-Biological Interactions 2014. **224**: p. 164-175.
3. Young, I. and J. Woodside, *Antioxidants in health and disease*. Journal of Clinical Pathology, 2001. **54**(3): p. 176-186.
4. Adam-Vizi, V. and C. Chinopoulos, *Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species*. Trends in Pharmacological Sciences, 2006. **27**(12): p. 639-645.
5. Ebadi, M., *Antioxidants and free radicals in health and disease: An introduction to reactive oxygen species, oxidative injury, neuronal cell death and therapy in neurodegenerative diseases*. 2001: Arizona: Prominent Press.
6. Hanukoglu, I., *Antioxidant protective mechanisms against reactive oxygen species (ROS) generated by mitochondrial P450 systems in steroidogenic cells*. Drug Metabolism Reviews, 2006. **38**(1-2): p. 171-196.
7. Schrader, M. and H.D. Fahimi, *Peroxisomes and oxidative stress*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 2006. **1763**(12): p. 1755-1766.
8. Agostinelli, E. and N. Seiler, *Non-irradiation-derived reactive oxygen species (ROS) and cancer: therapeutic implications*. Amino Acids, 2006. **31**(3): p. 341-55.
9. Riley, P.A., *Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation*. International Journal of Radiation Biology 1994. **65**(1): p. 27-33.
10. Svobodova, A., D. Walterova, and J. Vostalova, *Ultraviolet light induced alteration to the skin*. Biomedical Papers 2006. **150**(1): p. 25-38.
11. Traber, M.G., et al., *Tobacco-related diseases. Is there a role for antioxidant micronutrient supplementation?* Clinics In Chest Medicine, 2000. **21**(1): p. 173-87, x.
12. Powers, S.K., et al., *Reactive oxygen species: impact on skeletal muscle*. Comprehensive Physiology, 2011. **1**(2): p. 941-69.
13. Reid, M.B., *Nitric oxide, reactive oxygen species, and skeletal muscle contraction*. Medicine & Science in Sports & Exercise 2001. **33**(3): p. 371-6.
14. Halliwell, B. and J.M. Gutteridge, *Free radicals in biology and medicine*. 2015: Oxford University Press, USA.
15. Hunter, R.B., et al., *Activation of an alternative NF-kappaB pathway in skeletal muscle during disuse atrophy*. The FASEB Journal, 2002. **16**(6): p. 529-38.
16. Meyer, M., H.L. Pahl, and P.A. Baeuerle, *Regulation of the transcription factors NF-kappa B and AP-1 by redox changes*. Chemico-Biological Interactions 1994. **91**(2-3): p. 91-100.
17. Baeuerle, P.A. and D. Baltimore, *Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF-kappaB transcription factor*. Cell, 1988. **53**(2): p. 211-217.
18. Kaltschmidt, B., T. Sparna, and C. Kaltschmidt, *Activation of NF-kappa B by reactive oxygen intermediates in the nervous system*. Antioxidants & Redox Signaling, 1999. **1**(2): p. 129-144.
19. Sarkar, F.H. and Y. Li, *NF-kappaB: a potential target for cancer chemoprevention and therapy*. Frontiers in Bioscience, 2007. **13**: p. 2950-2959.
20. Morgan, M.J. and Z.-G. Liu, *Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling*. Cell Research, 2011. **21**(1): p. 103-115.
21. Allen, R. and M. Tresini, *Oxidative stress and gene regulation*. Free Radical Biology and Medicine, 2000. **28**(3): p. 463-499.
22. Kefaloyianni, E., C. Gaitanaki, and I. Beis, *ERK1/2 and p38-MAPK signalling pathways, through MSK1, are involved in NF-kappaB transactivation during oxidative stress in skeletal myoblasts*. Cellular Signalling, 2006. **18**(12): p. 2238-2251.

23. Simon, H.-U., A. Haj-Yehia, and F. Levi-Schaffer, *Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction*. *Apoptosis*, 2000. **5**(5): p. 415-418.
24. Wochna, A., et al., *A possible role of oxidative stress in the switch mechanism of the cell death mode from apoptosis to necrosis—studies on p 0 cells*. *Mitochondrion*, 2007. **7**(1): p. 119-124.
25. Mattson, M.P., *Apoptosis in neurodegenerative disorders*. *Nature Reviews Molecular Cell biology*, 2000. **1**(2): p. 120-130.
26. Frei, B., R. Stocker, and B.N. Ames, *Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1988. **85**(24): p. 9748-9752.
27. Halliwell, B. *How to characterize an antioxidant: an update*. in *Biochemical Society Symposia*. 1995. Portland Press Limited.
28. Krinsky, N.I., *Mechanism of action of biological antioxidants*. *Experimental Biology and Medicine*, 1992. **200**(2): p. 248-254.
29. Cao, X., et al., *Structures of the G85R variant of SOD1 in familial amyotrophic lateral sclerosis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2008. **283**(23): p. 16169-16177.
30. Wuerges, J., et al., *Crystal structure of nickel-containing superoxide dismutase reveals another type of active site*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2004. **101**(23): p. 8569-8574.
31. Zelko, I.N., T.J. Mariani, and R.J. Folz, *Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2002. **33**(3): p. 337-349.
32. Chelikani, P., I. Fita, and P.C. Loewen, *Diversity of structures and properties among catalases*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2004. **61**(2): p. 192-208.
33. Gaetani, G.F., et al., *Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes*. *Blood*, 1996. **87**(4): p. 1595-1599.
34. Brigelius-Flohé, R., *Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases*. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999. **27**(9): p. 951-965.
35. Hayes, J.D., J.U. Flanagan, and I.R. Jowsey, *Glutathione transferases*. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 2005. **45**: p. 51-88.
36. Meister, A. and M.E. Anderson, *Glutathione*. *Annual Review of Biochemistry* 1983. **52**: p. 711-60.
37. Meister, A., *Glutathione metabolism and its selective modification*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1988. **263**(33): p. 17205-17208.
38. Yu, B.P., *Cellular defenses against damage from reactive oxygen species*. *Physiological Reviews*, 1994. **74**(1): p. 139-162.
39. Meister, A., *Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1994. **269**(13): p. 9397-9400.
40. Padayatty, S.J., et al., *Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention*. *Journal of the American College of Nutrition*, 2003. **22**(1): p. 18-35.
41. Tan, D.-X., et al., *Significance of melatonin in antioxidative defense system: reactions and products*. *Neurosignals*, 2000. **9**(3-4): p. 137-159.
42. Traber, M.G. and J. Atkinson, *Vitamin E, antioxidant and nothing more*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2007. **43**(1): p. 4-15.
43. Wang, X. and P.J. Quinn, *Vitamin E and its function in membranes*. *Progress in Lipid Research*, 1999. **38**(4): p. 309-36.
44. Ames, B.N., et al., *Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant-and radical-caused aging and cancer: a hypothesis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1981. **78**(11): p. 6858-6862.
45. Davies, K., et al., *Uric acid-iron ion complexes. A new aspect of the antioxidant functions of uric acid*. *Biochemical Journal*, 1986. **235**(3): p. 747-754.
46. Barañano, D.E., et al., *Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002. **99**(25): p. 16093-16098.
47. Stocker, R., *Antioxidant activities of bile pigments*. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2004. **6**(5): p. 841-9.

48. Niki, E., *Antioxidant defenses in eukariotic cells: an overview*, in *Free Radicals: From Basic Science to Medicine*. 1993, Springer. p. 365-373.
49. Aguilera, Y., M.A. Martin-Cabrejas, and E.G. de Mejia, *Phenolic compounds in fruits and beverages consumed as part of the mediterranean diet: their role in prevention of chronic diseases*. *Phytochemistry Reviews*, 2016. **15**(3): p. 405-423.
50. Boeing, H., et al., *Critical review: vegetables and fruit in the prevention of chronic diseases*. *European Journal of Nutrition*, 2012. **51**(6): p. 637-663.
51. Who, J. and F.E. Consultation, *Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases*. World Health Organization technical report series, 2003. **916**(i-viii).
52. DeFelice, S., *Nutraceuticals: opportunities in an emerging market*. *Scrip Magazine*, 1992. **9**: p. 14-5.
53. Singh, S. and M.B. Devi, *Vegetables as a potential source of Nutraceuticals and phytochemicals: A Review*. *International Journal of Medicine and Pharmaceutical Sciences*, 2015. **5**(2): p. 1-14.
54. Ku, C.S., et al., *Health benefits of blue-green algae: prevention of cardiovascular disease and nonalcoholic fatty liver disease*. *Journal of Medicinal Food*, 2013. **16**(2): p. 103-111.
55. Lu, H.-K., et al., *Preventive effects of Spirulina platensis on skeletal muscle damage under exercise-induced oxidative stress*. *European Journal of Applied Physiology* 2006. **98**(2): p. 220-226.
56. Medzhitov, R., *Origin and physiological roles of inflammation*. *Nature*, 2008. **454**(7203): p. 428-35.
57. Pontieri, G.M., et al., *Patologia generale*. Vol. 1. 2011: Piccin.
58. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. *Cell*, 2006. **124**(4): p. 783-801.
59. Medzhitov, R., *Recognition of microorganisms and activation of the immune response*. *Nature*, 2007. **449**(7164): p. 819-826.
60. Feuillet, V., et al., *Involvement of Toll-like receptor 5 in the recognition of flagellated bacteria*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006. **103**(33): p. 12487-12492.
61. Oosting, M., et al., *Human TLR10 is an anti-inflammatory pattern-recognition receptor*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014. **111**(42): p. E4478-E4484.
62. Proell, M., et al., *The Nod-like receptor (NLR) family: a tale of similarities and differences*. *PloS One*, 2008. **3**(4): p. e2119.
63. Roach, J.C., et al., *The evolution of vertebrate Toll-like receptors*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2005. **102**(27): p. 9577-9582.
64. Nathan, C., *Points of control in inflammation*. *Nature*, 2002. **420**(6917): p. 846-852.
65. Gerhardt, T. and K. Ley, *Monocyte trafficking across the vessel wall*. *Cardiovascular Research*, 2015: p. cvv147.
66. Serhan, C.N. and J. Savill, *Resolution of inflammation: the beginning programs the end*. *Nature Immunology*, 2005. **6**(12): p. 1191-1197.
67. Ciccone, M.M., et al., *Inflammatory bowel disease, liver diseases and endothelial function: is there a linkage?* *Journal of Cardiovascular Medicine*, 2015. **16**(1): p. 11-21.
68. Costamagna, D., et al., *Role of inflammation in muscle homeostasis and myogenesis*. *Mediators of Inflammation*, 2015. **2015**.
69. Hansson, G.K., *Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease*. *New England Journal of Medicine*, 2005. **352**(16): p. 1685-1695.
70. Beal, A.L. and F.B. Cerra, *Multiple organ failure syndrome in the 1990s: systemic inflammatory response and organ dysfunction*. *Jama*, 1994. **271**(3): p. 226-233.
71. Peters, K., et al., *Molecular basis of endothelial dysfunction in sepsis*. *Cardiovascular Research*, 2003. **60**(1): p. 49-57.
72. Garrett, W.S., J.I. Gordon, and L.H. Glimcher, *Homeostasis and inflammation in the intestine*. *Cell*, 2010. **140**(6): p. 859-870.
73. Glass, C.K., et al., *Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration*. *Cell*, 2010. **140**(6): p. 918-934.
74. Grivnennikov, S.I., F.R. Greten, and M. Karin, *Immunity, inflammation, and cancer*. *Cell*, 2010. **140**(6): p. 883-899.

75. Imai, Y., et al., *Identification of oxidative stress and Toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury*. Cell, 2008. **133**(2): p. 235-249.
76. Sakurai, T., et al., *Hepatocyte necrosis induced by oxidative stress and IL-1 α release mediate carcinogen-induced compensatory proliferation and liver tumorigenesis*. Cancer Cell, 2008. **14**(2): p. 156-165.
77. Bartel, D.P., *MicroRNAs: target recognition and regulatory functions*. Cell, 2009. **136**(2): p. 215-33.
78. Sonkoly, E., M. Ståhle, and A. Pivarcsi. *MicroRNAs and immunity: novel players in the regulation of normal immune function and inflammation*. in *Seminars in Cancer Biology*. 2008. Elsevier.
79. Chandrasekaran, K., et al., *Role of microRNAs in kidney homeostasis and disease*. Kidney International, 2012. **81**(7): p. 617-627.
80. Stark, K.L., et al., *Altered brain microRNA biogenesis contributes to phenotypic deficits in a 22q11-deletion mouse model*. Nature Genetics, 2008. **40**(6): p. 751-760.
81. Fernandez-Valverde, S.L., R.J. Taft, and J.S. Mattick, *MicroRNAs in β -cell biology, insulin resistance, diabetes and its complications*. Diabetes, 2011. **60**(7): p. 1825-1831.
82. Calin, G.A. and C.M. Croce, *MicroRNA signatures in human cancers*. Nature Reviews Cancer, 2006. **6**(11): p. 857-866.
83. Lujambio, A. and S.W. Lowe, *The microcosmos of cancer*. Nature, 2012. **482**(7385): p. 347-355.
84. Qin, B., H. Yang, and B. Xiao, *Role of microRNAs in endothelial inflammation and senescence*. Molecular Biology Reports, 2012. **39**(4): p. 4509-4518.
85. Urbich, C., A. Kuehbacher, and S. Dimmeler, *Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation and angiogenesis*. Cardiovascular Research, 2008.
86. Kuehbacher, A., et al., *Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis*. Circulation Research, 2007. **101**(1): p. 59-68.
87. O'Neill, L.A., F.J. Sheedy, and C.E. McCoy, *MicroRNAs: the fine-tuners of Toll-like receptor signalling*. Nature Reviews Immunology, 2011. **11**(3): p. 163-175.
88. Taganov, K.D., et al., *NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006. **103**(33): p. 12481-12486.
89. He, X., Z. Jing, and G. Cheng, *MicroRNAs: new regulators of Toll-like receptor signalling pathways*. BioMed Research International, 2014. **2014**.
90. Boldin, M.P., et al., *miR-146a is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice*. The Journal of Experimental Medicine, 2011. **208**(6): p. 1189-1201.
91. Hou, J., et al., *MicroRNA-146a feedback inhibits RIG-I-dependent Type I IFN production in macrophages by targeting TRAF6, IRAK1, and IRAK2*. The Journal of Immunology, 2009. **183**(3): p. 2150-2158.
92. Zhao, J.L., et al., *NF- κ B dysregulation in microRNA-146a-deficient mice drives the development of myeloid malignancies*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011. **108**(22): p. 9184-9189.
93. Jayadev, S., et al., *Presenilin 2 influences miR146 level and activity in microglia*. Journal of Neurochemistry, 2013. **127**(5): p. 592-599.
94. Fish, J.E., et al., *miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity*. Developmental cell, 2008. **15**(2): p. 272-284.
95. Harris, T.A., et al., *MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. **105**(5): p. 1516-1521.
96. Angel-Morales, G., G. Noratto, and S.U. Mertens-Talcott, *Standardized curcuminoid extract (Curcuma longa L.) decreases gene expression related to inflammation and interacts with associated microRNAs in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC)*. Food & Function, 2012. **3**(12): p. 1286-1293.
97. Fraternali, D., et al., *Chemical composition and "in vitro" anti-inflammatory activity of Vitis vinifera L. (var. Sangiovese) tendrils extract*. Journal of Functional Foods, 2016. **20**: p. 291-302.
98. Charge, S.B. and M.A. Rudnicki, *Cellular and molecular regulation of muscle regeneration*. Physiological Reviews, 2004. **84**(1): p. 209-238.

99. Collins, C.A., et al., *Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche*. *Cell*, 2005. **122**(2): p. 289-301.
100. Huard, J., Y. Li, and F.H. Fu, *Muscle injuries and repair: current trends in research*. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 2002. **84**(5): p. 822-832.
101. Levy, M.N., et al., *Berne & Levy principles of physiology*. 2006: Elsevier Mosby.
102. Moss, R., *Ca²⁺ regulation of mechanical properties of striated muscle. Mechanistic studies using extraction and replacement of regulatory proteins*. *Circulation Research*, 1992. **70**(5): p. 865-884.
103. Mauro, A., *Satellite cell of skeletal muscle fibers*. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 1961. **9**(2): p. 493-495.
104. Holterman, C.E. and M.A. Rudnicki. *Molecular regulation of satellite cell function*. in *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2005. Elsevier.
105. Partridge, T., M. Grounds, and J. Sloper, *Evidence of fusion between host and donor myoblasts in skeletal muscle grafts*. *Nature* 1978. **273**: p. 306-308.
106. Sabourin, L.A. and M.A. Rudnicki, *The molecular regulation of myogenesis*. *Clinical Genetics*, 2000. **57**(1): p. 16-25.
107. Lowe, D.A., T. Lund, and S.E. Alway, *Hypertrophy-stimulated myogenic regulatory factor mRNA increases are attenuated in fast muscle of aged quails*. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 1998. **275**(1): p. C155-C162.
108. Dedieu, S., et al., *Involvement of myogenic regulator factors during fusion in the cell line C2C12*. *International Journal of Developmental Biology*, 2002. **46**(2): p. 235-241.
109. Louis, M., et al., *Creatine increases IGF-I and myogenic regulatory factor mRNA in C2C12 cells*. *FEBS Letters*, 2004. **557**(1-3): p. 243-247.
110. Kislinger, T., et al., *Proteome dynamics during C2C12 myoblast differentiation*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2005. **4**(7): p. 887-901.
111. Barash, I.A., et al., *Structural and regulatory roles of muscle ankyrin repeat protein family in skeletal muscle*. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2007. **293**(1): p. C218-C227.
112. Jacquemin, V., et al., *IL-13 mediates the recruitment of reserve cells for fusion during IGF-1-induced hypertrophy of human myotubes*. *Journal of Cell Science*, 2007. **120**(4): p. 670-681.
113. Ueyama, T., et al., *Identification of the functional domain in the transcription factor RTEF-1 that mediates α 1-adrenergic signaling in hypertrophied cardiac myocytes*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000. **275**(23): p. 17476-17480.
114. Forcales, S.V. and P.L. Puri. *Signaling to the chromatin during skeletal myogenesis: novel targets for pharmacological modulation of gene expression*. in *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2005. Elsevier.
115. Langen, R.C., et al., *Tumor necrosis factor- α inhibits myogenesis through redox-dependent and-independent pathways*. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2002. **283**(3): p. C714-C721.
116. Buck, M. and M. Chojkier, *Muscle wasting and dedifferentiation induced by oxidative stress in a murine model of cachexia is prevented by inhibitors of nitric oxide synthesis and antioxidants*. *The EMBO journal*, 1996. **15**(8): p. 1753.
117. Dillard, C., et al., *Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation*. *Journal of Applied Physiology*, 1978. **45**(6): p. 927-932.
118. Davies, K.J., et al., *Free radicals and tissue damage produced by exercise*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1982. **107**(4): p. 1198-1205.
119. Ashton, T., et al., *Electron spin resonance spectroscopic detection of oxygen-centred radicals in human serum following exhaustive exercise*. *European Journal of Applied Physiology* 1998. **77**(6): p. 498-502.
120. Sen, C.K., et al., *Oxidative stress after human exercise: effect of N-acetylcysteine supplementation*. *Journal of Applied Physiology* 1994. **76**(6): p. 2570-7.
121. Wierzba, T.H., et al., *Lymphocyte DNA damage in rats challenged with a single bout of strenuous exercise*. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 2006. **57 Suppl 10**: p. 115-31.
122. Cooper, C.E., et al., *Exercise, free radicals and oxidative stress*. *Biochemical Society Transactions*, 2002. **30**(2): p. 280-5.

123. Tidball, J.G., *Inflammatory processes in muscle injury and repair*. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2005. **288**(2): p. R345-R353.
124. Pizza, F.X., et al., *Neutrophils contribute to muscle injury and impair its resolution after lengthening contractions in mice*. The Journal of Physiology, 2005. **562**(3): p. 899-913.
125. Messina, S., et al., *Lipid peroxidation inhibition blunts nuclear factor- κ B activation, reduces skeletal muscle degeneration, and enhances muscle function in mdx mice*. The American Journal of Pathology, 2006. **168**(3): p. 918-926.
126. Fulle, S., et al., *The contribution of reactive oxygen species to sarcopenia and muscle ageing*. Experimental Gerontology, 2004. **39**(1): p. 17-24.
127. Tarabees, R., et al., *Endotoxin transiently inhibits protein synthesis through Akt and MAPK mediating pathways in C2C12 myotubes*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2011. **301**(4): p. C895-C902.
128. Orellana, R.A., et al., *Endotoxemia reduces skeletal muscle protein synthesis in neonates*. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 2002. **283**(5): p. E909-E916.
129. Doyle, A., et al., *Toll-like receptor 4 mediates lipopolysaccharide-induced muscle catabolism via coordinate activation of ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome pathways*. The FASEB Journal, 2011. **25**(1): p. 99-110.
130. Philippou, A., et al., *Cytokines in muscle damage*. Advances in Clinical Chemistry, 2012. **58**: p. 49.
131. Zoico, E. and R. Roubenoff, *The role of cytokines in regulating protein metabolism and muscle function*. Nutrition Reviews, 2002. **60**(2): p. 39-51.
132. Eisenberg, I., et al., *Distinctive patterns of microRNA expression in primary muscular disorders*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. **104**(43): p. 17016-17021.
133. Greco, S., et al., *Common micro-RNA signature in skeletal muscle damage and regeneration induced by Duchenne muscular dystrophy and acute ischemia*. The FASEB Journal, 2009. **23**(10): p. 3335-3346.
134. Güller, I. and A.P. Russell, *MicroRNAs in skeletal muscle: their role and regulation in development, disease and function*. The Journal of Physiology, 2010. **588**(21): p. 4075-4087.
135. Hudson, M.B., et al., *miR-182 attenuates atrophy-related gene expression by targeting FoxO3 in skeletal muscle*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2014. **307**(4): p. C314-C319.
136. Wada, S., et al., *Translational suppression of atrophic regulators by microRNA-23a integrates resistance to skeletal muscle atrophy*. The Journal of Biological Chemistry, 2011. **286**(44): p. 38456-38465.
137. Williams, A.H., et al., *MicroRNA control of muscle development and disease*. Current Opinion in Cell Biology, 2009. **21**(3): p. 461-469.
138. Chen, J., Z. Liu, and Y. Yang, *In vitro screening of LPS-induced miRNAs in leukocytes derived from cord blood and their possible roles in regulating TLR signals*. Pediatric Research, 2014. **75**(5): p. 595-602.
139. Cheng, Y., et al., *Downregulation of miR-27a* and miR-532-5p and upregulation of miR-146a and miR-155 in LPS-induced RAW264. 7 macrophage cells*. Inflammation, 2012. **35**(4): p. 1308-1313.
140. Moon, H.G., et al., *miR-15a/16 regulates macrophage phagocytosis after bacterial infection*. The Journal of Immunology, 2014. **193**(9): p. 4558-67.
141. Moschos, S.A., et al., *Expression profiling in vivo demonstrates rapid changes in lung microRNA levels following lipopolysaccharide-induced inflammation but not in the anti-inflammatory action of glucocorticoids*. BMC Genomics, 2007. **8**(1): p. 1.
142. Cavalier-Smith, T., *The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2002. **52**(2): p. 297-354.
143. Foster, J.S., et al., *Molecular and morphological characterization of cyanobacterial diversity in the stromatolites of Highborne Cay, Bahamas*. The ISME Journal, 2009. **3**(5): p. 573-587.
144. Schopf, J.W., *The fossil record of cyanobacteria*, in *Ecology of Cyanobacteria II*. 2012, Springer. p. 15-36.

145. Hoffmann, L., *Nomenclature of Cyanophyta/Cyanobacteria: roundtable on the unification of the nomenclature under the Botanical and Bacteriological Codes*. Algological Studies, 2005. **117**(1): p. 13-29.
146. Schirromeister, B.E., A. Antonelli, and H.C. Bagheri, *The origin of multicellularity in cyanobacteria*. BMC Evolutionary Biology, 2011. **11**(1): p. 1.
147. Shih, P.M., et al., *Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using diversity-driven genome sequencing*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013. **110**(3): p. 1053-1058.
148. Rippka, R., et al., *Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria*. Microbiology, 1979. **111**(1): p. 1-61.
149. Castenholz, R.W., et al., *Phylum BX. Cyanobacteria*, in *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. 2001, Springer. p. 473-599.
150. Komarek, J., et al., *Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach*. Preslia, 2014. **86**(4): p. 295-335.
151. Funari, E. and E. Testai, *Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure*. Critical Reviews in Toxicology, 2008. **38**(2): p. 97-125.
152. Carmichael, W., *Cyanobacteria secondary metabolites—the cyanotoxins*. Journal of Applied Bacteriology, 1992. **72**(6): p. 445-459.
153. Mynderse, J.S., et al., *Antileukemia activity in the Oscillatoriaceae: isolation of Debromoaplysiatoxin from Lyngbya*. Science, 1977. **196**(4289): p. 538-540.
154. da Silva Vaz, B., et al., *Microalgae as a new source of bioactive compounds in food supplements*. Current Opinion in Food Science, 2016. **7**: p. 73-77.
155. Hoiczky, E. and A. Hansel, *Cyanobacterial cell walls: news from an unusual prokaryotic envelope*. Journal of Bacteriology, 2000. **182**(5): p. 1191-1199.
156. Praglia, C., *Microbiologia*. 1999: Giunti.
157. Pupillo, P., et al., *Biologia vegetale*. 2003: Zanichelli.
158. Van De Meene, A.M., et al., *The three-dimensional structure of the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803*. Archives of Microbiology, 2006. **184**(5): p. 259-270.
159. Olson, J.M., *Photosynthesis in the Archean era*. Photosynthesis Research, 2006. **88**(2): p. 109-117.
160. Stewart, I. and I.R. Falconer, *Cyanobacteria and cyanobacterial toxins*, in *Oceans and Human Health: Risks and Remedies from the Seas*. 2008. p. 271-296.
161. Samsonoff, W.A. and R. MacColl, *Biliproteins and phycobilisomes from cyanobacteria and red algae at the extremes of habitat*. Archives of Microbiology, 2001. **176**(6): p. 400-405.
162. Singh, N.K., et al., *The phycobilisomes: an early requisite for efficient photosynthesis in cyanobacteria*. EXCLI Journal, 2015. **14**: p. 268.
163. Scheer, H. and K.H. Zhao, *Biliprotein maturation: the chromophore attachment*. Molecular Microbiology, 2008. **68**(2): p. 263-276.
164. Grossman, A.R., et al., *The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions*. Microbiological Reviews, 1993. **57**(3): p. 725-749.
165. Kikuchi, H., et al., *Significance of a two-domain structure in subunits of phycobiliproteins revealed by the normal mode analysis*. Biophysical Journal, 2000. **79**(3): p. 1587-1600.
166. MacColl, R., *Cyanobacterial phycobilisomes*. Journal of Structural Biology, 1998. **124**(2): p. 311-334.
167. MacColl, R., *Allophycocyanin and energy transfer*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 2004. **1657**(2): p. 73-81.
168. Priyadarshani, I. and B. Rath, *Commercial and industrial applications of micro algae—A review*. Journal of Algal Biomass Utilization, 2012. **3**(4): p. 89-100.
169. Carmichael, W.W., C. Drapeau, and D.M. Anderson, *Harvesting of Aphanizomenon flos-aquae Ralfs ex Born. & Flah. Var. flos-aquae (Cyanobacteria) from Klamath Lake for human dietary use*. Journal of Applied Phycology, 2000. **12**(6): p. 585-595.
170. Gao, K., *Chinese studies on the edible blue-green alga, Nostoc flagelliforme: a review*. Journal of Applied Phycology, 1998. **10**(1): p. 37-49.
171. Bishop, W.M. and H.M. Zubeck, *Evaluation of microalgae for use as nutraceuticals and nutritional supplements*. Journal of Nutrition & Food Sciences, 2012. **2012**.

172. Pandey, M., R.K. Verma, and S.A. Saraf, *Nutraceuticals: new era of medicine and health*. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, 2010. **3**(1): p. 11-15.
173. Singh, S., B.N. Kate, and U. Banerjee, *Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: an overview*. Critical Reviews in Biotechnology, 2005. **25**(3): p. 73-95.
174. Pangestuti, R. and S.-K. Kim, *Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae*. Journal of Functional Foods, 2011. **3**(4): p. 255-266.
175. Dashwood, R. and D. Guo. *Protective properties of chlorophylls against the covalent binding of heterocyclic amines to DNA in vitro and in vivo*. in *Princess Takamatsu Symposia*. 1994.
176. Benedetti, S., et al., *Antioxidant properties of a novel phycocyanin extract from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae**. Life Sciences, 2004. **75**(19): p. 2353-2362.
177. Benedetti, S., et al., *Oxygen radical absorbance capacity of phycocyanin and phycocyanobilin from the food supplement *Aphanizomenon flos-aquae**. Journal of Medicinal Food, 2010. **13**(1): p. 223-227.
178. Kushak, R.I., et al., *Favorable effects of blue-green algae *Aphanizomenon flos-aquae* on rat plasma lipids*. Journal of the American Nutraceutical Association, 2000. **2**(3): p. 59-65.
179. Miyamoto, E., et al., *Purification and characterization of a corrinoid-compound in an edible cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* as a nutritional supplementary food*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006. **54**(25): p. 9604-9607.
180. DeWille, J.W., P.J. Fraker, and D.R. Romsos, *Effects of essential fatty acid deficiency, and various levels of dietary polyunsaturated fatty acids, on humoral immunity in mice*. The Journal of Nutrition, 1979. **109**(6): p. 1018-1027.
181. Kris-Etherton, P.M., et al., *Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease*. Circulation, 2002. **106**(21): p. 2747-2757.
182. Hibbeln, J.R. and N. Salem, *Dietary polyunsaturated fatty acids and depression: when cholesterol does not satisfy*. The American Journal of Clinical Nutrition, 1995. **62**(1): p. 1-9.
183. Manoukian, R., *Effects of the blue green algae *Aphanizomenon Flos Aquae* on human natural killer cells*, in *Phytoceuticals, IBC Library Series*. 1998. p. 233-241.
184. Ostensvik, O., et al., *Antibacterial properties of extracts from selected planktonic freshwater cyanobacteria-a comparative study of bacterial bioassays*. Journal of Applied Microbiology, 1998. **84**(6): p. 1117-1124.
185. Smith, D.L., et al., *Eskimo plasma constituents, dihomo- γ -linolenic acid, eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid inhibit the release of atherogenic mitogens*. Lipids, 1989. **24**(1): p. 70-75.
186. Pugh, N., et al., *Isolation of three high molecular weight polysaccharide preparations with potent immunostimulatory activity from *Spirulina platensis*, *Aphanizomenon flos-aquae* and *Chlorella pyrenoidosa**. Planta medica, 2001. **67**(08): p. 737-742.
187. Scoglio, S., et al., *Selective monoamine oxidase B inhibition by an *Aphanizomenon flos-aquae* extract and by its constitutive active principles phycocyanin and mycosporine-like amino acids*. Phytomedicine, 2014. **21**(7): p. 992-997.
188. Scoglio, S., et al., *Inhibitory effects of *Aphanizomenon flos-aquae* constituents on human UDP-glucose dehydrogenase activity*. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2016: p. 1-6.
189. Schaeffer, D.J., P.B. Malpas, and L.L. Barton, *Risk assessment of microcystin in dietary *Aphanizomenon flos-aquae**. Ecotoxicology and Environmental Safety, 1999. **44**(1): p. 73-80.
190. Scoglio, S., et al., *Extracts of *Aphanizomenon Flos Aquae* and nutritional, cosmetic and pharmaceutical compositions containing the same*. 2012, Google Patents.
191. Caddeo, C., et al., *Extraction, purification and nanoformulation of natural phycocyanin (from *Klamath algae*) for dermal and deeper soft tissue delivery*. Journal of Biomedical Nanotechnology 2013. **9**(11): p. 1929-38.
192. Castangia, I., et al., *Phycocyanin-encapsulating hyalurosomes as carrier for skin delivery and protection from oxidative stress damage*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 2016. **27**(4): p. 75.

193. Benedetti, S., et al., *Purification and characterization of phycocyanin from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae**. Journal of Chromatography B, 2006. **833**(1): p. 12-18.
194. Bermejo, R., E.M. Talavera, and J.C. Orte, *Chromatographic purification of biliproteins from *Spirulina platensis* high-performance liquid chromatographic separation of their α and β subunits*. Journal of Chromatography A, 1997. **778**(1): p. 441-450.
195. Boussiba, S. and A.E. Richmond, *Isolation and characterization of phycocyanins from the blue-green alga *Spirulina platensis**. Archives of Microbiology, 1979. **120**(2): p. 155-159.
196. Kamble, S.P., et al., *Extraction and purification of C-phycocyanin from dry *Spirulina* powder and evaluating its antioxidant, anticoagulation and prevention of DNA damage activity*. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 2013. **3**(8): p. 149.
197. Patil, G., et al., *Method to obtain C-phycocyanin of high purity*. Journal of Chromatography A, 2006. **1127**(1): p. 76-81.
198. Zhang, Y.-M. and F. Chen, *A simple method for efficient separation and purification of c-phycocyanin and allophycocyanin from *Spirulina platensis**. Biotechnology Techniques, 1999. **13**(9): p. 601-603.
199. Fernández-Rojas, B., J. Hernández-Juárez, and J. Pedraza-Chaverri, *Nutraceutical properties of phycocyanin*. Journal of Functional Foods, 2014. **11**: p. 375-392.
200. Romay, C., et al., *Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycocyanin from blue-green algae*. Inflammation Research, 1998. **47**(1): p. 36-41.
201. Bhat, V.B. and K. Madyastha, *C-phycocyanin: a potent peroxyl radical scavenger in vivo and in vitro*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000. **275**(1): p. 20-25.
202. Bermejo-Bescós, P., E. Piñero-Estrada, and Á.M.V. del Fresno, *Neuroprotection by *Spirulina platensis* protean extract and phycocyanin against iron-induced toxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells*. Toxicology in Vitro, 2008. **22**(6): p. 1496-1502.
203. Bermejo, P., E. Piñero, and Á.M. Villar, *Iron-chelating ability and antioxidant properties of phycocyanin isolated from a protean extract of *Spirulina platensis**. Food Chemistry, 2008. **110**(2): p. 436-445.
204. Zheng, J., et al., *Phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis* protect against diabetic nephropathy by inhibiting oxidative stress*. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2013. **304**(2): p. R110-R120.
205. Deguchi, K., et al., *Reduction of cerebral infarction in rats by biliverdin associated with amelioration of oxidative stress*. Brain Research, 2008. **1188**: p. 1-8.
206. Gonzalez-Sanchez, E., et al., *Protective role of biliverdin against bile acid-induced oxidative stress in liver cells*. Free Radical Biology and Medicine, 2016. **97**: p. 466-477.
207. Marín-Prida, J., et al., *C-Phycocyanin protects SH-SY5Y cells from oxidative injury, rat retina from transient ischemia and rat brain mitochondria from Ca²⁺/phosphate-induced impairment*. Brain Research Bulletin, 2012. **89**(5): p. 159-167.
208. Farooq, S.M., et al., *C-phycocyanin confers protection against oxalate-mediated oxidative stress and mitochondrial dysfunctions in MDCK cells*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. e93056.
209. Romay, C., N. Ledón, and R. González, *Further studies on anti-inflammatory activity of phycocyanin in some animal models of inflammation*. Inflammation Research, 1998. **47**(8): p. 334-338.
210. Romay, C., et al., *Effects of phycocyanin extract on tumor necrosis factor- α and nitrite levels in serum of mice treated with endotoxin*. Arzneimittelforschung, 2001. **51**(09): p. 733-736.
211. Romay, C., et al., *C-phycocyanin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects*. Current Protein and Peptide Science, 2003. **4**(3): p. 207-216.
212. Gonzalez, R., et al., *Anti-inflammatory activity of phycocyanin extract in acetic acid-induced colitis in rats*. Pharmacological Research, 1999. **39**(1): p. 55-59.
213. Chen, J.-C., et al., **Spirulina* and C-phycocyanin reduce cytotoxicity and inflammation-related genes expression of microglial cells*. Nutritional Neuroscience, 2012. **15**(6): p. 252-256.
214. Leung, P.-o., et al., *Therapeutic effect of C-phycocyanin extracted from blue green algae in a rat model of acute lung injury induced by lipopolysaccharide*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013. **2013**.

215. Sun, Y., et al., *The protective effect of C-phycoerythrin on paraquat-induced acute lung injury in rats*. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2011. **32**(2): p. 168-174.
216. Chen, H.-W., et al., *Purification and immunomodulating activity of C-phycoerythrin from Spirulina platensis cultured using power plant flue gas*. Process Biochemistry, 2014. **49**(8): p. 1337-1344.
217. Pugh, N. and D. Pasco, *Characterization of human monocyte activation by a water soluble preparation of Aphanizomenon flos-aquae*. Phytomedicine, 2001. **8**(6): p. 445-453.
218. Cian, R.I.E., et al., *Immunomodulatory properties of the protein fraction from Phorphyra columbina*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012. **60**(33): p. 8146-8154.
219. Grzanna, R., et al., *Immobilin, a high-molecular-weight polysaccharide fraction of Spirulina, enhances chemokine expression in human monocytic THP-1 cells*. Journal of Alternative & Complementary Medicine, 2006. **12**(5): p. 429-435.
220. Pardhasaradhi, B.V., et al., *Phycocyanin-mediated apoptosis in AK-5 tumor cells involves down-regulation of Bcl-2 and generation of ROS*. Molecular Cancer Therapeutics, 2003. **2**(11): p. 1165-1170.
221. Ravi, M., et al., *Molecular mechanism of anti-cancer activity of phycocyanin in triple-negative breast cancer cells*. BMC Cancer, 2015. **15**(1): p. 1.
222. Subhashini, J., et al., *Molecular mechanisms in C-Phycocyanin induced apoptosis in human chronic myeloid leukemia cell line-K562*. Biochemical Pharmacology, 2004. **68**(3): p. 453-462.
223. Nishanth, R.P., et al., *C-Phycocyanin inhibits MDR1 through reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 mediated pathways in human hepatocellular carcinoma cell line*. European Journal of Pharmacology, 2010. **649**(1): p. 74-83.
224. Gupta, M., U.N. Dwivedi, and S. Khandelwal, *C-Phycocyanin: an effective protective agent against thymic atrophy by tributyltin*. Toxicology Letters 2011. **204**(1): p. 2-11.
225. Wu, L.-C., et al., *Antimelanogenic effect of c-phycoerythrin through modulation of tyrosinase expression by upregulation of ERK and downregulation of p38 MAPK signaling pathways*. Journal of Biomedical Science, 2011. **18**(1): p. 1.
226. Manconia, M., et al., *Phycocyanin liposomes for topical anti-inflammatory activity: in-vitro in-vivo studies*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2009. **61**(4): p. 423-430.
227. Minic, S.L., et al., *Digestion by pepsin releases biologically active chromopeptides from C-phycoerythrin, a blue-colored biliprotein of microalga Spirulina*. Journal of Proteomics, 2016.
228. Burattini, S., et al., *C2C12 murine myoblasts as a model of skeletal muscle development: morpho-functional characterization*. European Journal of Histochemistry, 2004. **48**(3): p. 223.
229. Sestili, P., C. Martinelli, and V. Stocchi, *The fast halo assay: an improved method to quantify genomic DNA strand breakage at the single-cell level*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2006. **607**(2): p. 205-214.
230. Kang, J.S., et al., *Silymarin inhibits TNF- α -induced expression of adhesion molecules in human umbilical vein endothelial cells*. FEBS Letters, 2003. **550**(1-3): p. 89-93.
231. McAleer, C.W., et al., *Mechanistic investigation of adult myotube response to exercise and drug treatment in vitro using a multiplexed functional assay system*. Journal of Applied Physiology, 2014. **117**(11): p. 1398-1405.
232. Guescini, M., et al., *Muscle releases alpha-sarcoglycan positive extracellular vesicles carrying mirnas in the bloodstream*. PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0125094.
233. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry, 1976. **72**(1-2): p. 248-254.
234. Liu, H.-t., et al., *Chitosan oligosaccharides suppress LPS-induced IL-8 expression in human umbilical vein endothelial cells through blockade of p38 and Akt protein kinases*. Acta Pharmacologica Sinica, 2011. **32**(4): p. 478-486.
235. Moustacchi, E., *DNA damage and repair: consequences on dose-responses*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2000. **464**(1): p. 35-40.
236. Palus, S., S. von Haehling, and J. Springer, *Muscle wasting: an overview of recent developments in basic research*. Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle, 2014. **5**(3): p. 193-198.

237. Shiota, C., et al., *Flavones inhibit LPS-induced atrogen-1/MAFbx expression in mouse C2C12 skeletal myotubes*. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 2015. **61**(2): p. 188-194.
238. Kuang, W., et al., *Cyclic stretch induced miR-146a upregulation delays C2C12 myogenic differentiation through inhibition of Numb*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009. **378**(2): p. 259-263.
239. Zhang, J., et al., *Analysis of MicroRNA expression profiles in weaned pig skeletal muscle after lipopolysaccharide challenge*. International Journal of Molecular Sciences, 2015. **16**(9): p. 22438-22455.
240. Pineda-Molina, E., et al., *Glutathionylation of the p50 subunit of NF-kappaB: a mechanism for redox-induced inhibition of DNA binding*. Biochemistry, 2001. **40**(47): p. 14134-42.
241. Toledano, M.B. and W.J. Leonard, *Modulation of transcription factor NF-kappa B binding activity by oxidation-reduction in vitro*. Proceedings of the National Academy of Sciences 1991. **88**(10): p. 4328-32.
242. Sestili, P., et al., *Plant-derived phenolic compounds prevent the DNA single-strand breakage and cytotoxicity induced by tert-butylhydroperoxide via an iron-chelating mechanism*. Biochemical Journal, 2002. **364**(1): p. 121-128.
243. Kim, T.H. and J.-S. Bae, *Ecklonia cava extracts inhibit lipopolysaccharide induced inflammatory responses in human endothelial cells*. Food and Chemical Toxicology, 2010. **48**(6): p. 1682-1687.
244. Chen, L., et al., *Toll-like receptor 4 has an essential role in early skin wound healing*. Journal of Investigative Dermatology, 2013. **133**(1): p. 258-267.
245. Eslani, M., et al., *The Role of Toll-Like Receptor 4 in Corneal Epithelial Wound Healing*TLR4 in Corneal Epithelial Wound Healing. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2014. **55**(9): p. 6108-6115.
246. Dasu, M.R. and I. Jialal, *Amelioration in wound healing in diabetic toll-like receptor-4 knockout mice*. Journal of Diabetes and its Complications, 2013. **27**(5): p. 417-421.
247. Pukstad, B.S., et al., *Non-healing is associated with persistent stimulation of the innate immune response in chronic venous leg ulcers*. Journal of Dermatological Science, 2010. **59**(2): p. 115-122.

RINGRAZIAMENTI

Desidero innanzitutto ringraziare il Prof. Piero Sestili, il Dott. Stefano Scoglio, la Dott.ssa Evelin Colombo e la Regione Marche per aver reso possibile la realizzazione di questo progetto.

Ringrazio inoltre la Prof.ssa Maria Cristina Albertini, la Dott.ssa Cinzia Calcabrini, il Dott. Michele Guescini ed il Dott. Giosuè Annibalini per la loro preziosa collaborazione.

Un sincero ringraziamento va anche a tutta la sezione di Scienze Motorie e della Salute del Dipartimento di Scienze Biomolecolari di Urbino, per avermi insegnato tanto in questi tre anni ed avermi fatto sentire come a casa.