



**Università
degli Studi
di Palermo**

AREA QUALITÀ, PROGRAMMAZIONE E SUPPORTO
STRATEGICO
SETTORE STRATEGIA PER LA RICERCA
U. O. DOTTORATI

Dottorato di Ricerca in Medicina Molecolare e Clinica

Dipartimento di Promozione della Salute, Materno-Infantile, di Medicina Interna e
Specialistica di Eccellenza “G. D’Alessandro” (PROMISE)
MED/04

**Effetti anti-infiammatori e antiossidanti di estratti polifenolici da
olio extravergine d'oliva siciliano:
ottimi candidati “naturali” come coadiuvanti del trattamento
dell'Artrite Reumatoide**

**IL DOTTORE
BARTOLO TAMBURINI**

**IL COORDINATORE
PROF. ANTONINO TUTTOLOMONDO**

**IL TUTOR
PROF.SSA GIULIANA GUGGINO**

**CICLO XXXVII
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2025**

A

**Valentina, mia moglie, che ha condiviso ogni passo
di questo viaggio con amore e sacrificio,
e alla nostra preziosa figlia Aurora Maria,
che con la sua innocenza e gioia mi ha dato la forza,
illuminando i giorni più difficili di questo percorso**

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1. Artrite Reumatoide	1
1.2. Patogenesi.....	4
1.3. Ruolo della risposta immunitaria nell'insorgenza e nella progressione dell'Artrite Reumatoide	5
1.4. Quadro clinico, diagnosi e terapia dell'Artrite Reumatoide.....	7
1.5. Dieta mediterranea e Olio extravergine d'oliva	13
1.6 Composizione chimica dell'Olio extravergine d'oliva.....	18
2. OBIETTIVO DELLO STUDIO	28
3. MATERIALI E METODI	29
3.1. Estrazione chimica dei polifenoli da olio extravergine d'oliva e successiva caratterizzazione tramite cromatografia liquida e spettrometria di massa (HPLC/MS)	29
3.2. Reclutamento pazienti	29
3.3. Saggio di vitalità.....	30
3.4. Attività di radical scavenging	31
3.5. Isolamento PBMCs, marcatura intracellulare e analisi citofluorimetrica.....	31
3.6. Espressione intracellulare delle specie reattive dell'ossigeno.....	33
3.7. Analisi Western Blot.....	33
3.8. Analisi Statistica.....	35
4. RISULTATI	36

4.1. Caratterizzazione dei composti fitochimici presenti negli estratti arricchiti in PE-EVOOs.....	36
4.2. Effetti dei PE-EVOOs sulla vitalità cellulare	37
4.3. Saggi di attività di “radical scavenging” dei PE-EVOOs.....	38
4.4. Analisi citofluorimetrica degli effetti antinfiammatori <i>in vitro</i> dei PE- EVOO sulle PBMCs di pazienti con AR e sulle PBMCs di soggetti sani stimolate con LPS.....	39
4.5. Il trattamento con i PE-EVOOs riduce la produzione dei ROS nelle PBMCs dei pazienti con AR e nelle PBMCs di soggetti sani stimolate con LPS.....	43
4.6. Il trattamento con i PE-EVOO aumenta i livelli di espressione di Nrf-2 e dei suoi target trascrizionali catalasi e MnSOD nelle PBMCs di pazienti con AR e HS stimolate con LPS.....	45
4.7. Il trattamento con i PE-EVOO riduce l’attivazione di Nf-KB nelle PBMCs di pazienti con AR e HS stimolate con LPS.....	47
5. DISCUSSIONE	49
6. CONCLUSIONI	54
7. BIBLIOGRAFIA	55
8. PUBBLICAZIONI	62
9. RINGRAZIAMENTI	64

1. INTRODUZIONE

1.1. ARTRITE REUMATOIDE

L'artrite reumatoide (AR) è una malattia infiammatoria cronica sistemica di natura autoimmune e con eziologia ancora sconosciuta, che presenta manifestazioni sia articolari che extra-articolari (1). Il decorso cronico e degenerativo della malattia, insieme alla progressione del danno strutturale e funzionale, influisce negativamente sulla qualità della vita dei pazienti e comporta un aumento dei costi per il sistema sanitario nazionale.

Il trattamento in ambito reumatologico segue le linee guida internazionali e prevede spesso l'impiego combinato di farmaci per migliorarne l'efficacia. Tuttavia, in molti casi, non si riesce a ottenere una completa risoluzione dei sintomi debilitanti, come il dolore e le riacutizzazioni, con i soli antinfiammatori, analgesici o corticosteroidi. Di conseguenza, l'integrazione della terapia standard con molecole sicure rappresenta un'esigenza ancora non completamente soddisfatta in reumatologia.

Attualmente, la strategia di gestione si concentra unicamente sulla riduzione dei sintomi a livello articolare e sul rallentamento della progressione verso la disabilità tramite la somministrazione di farmaci antireumatici modificanti la malattia (DMARDs), come il metotrexato, i farmaci biologici come gli anti-TNF- α , o i target sintetici come i jak inibitori, a volte in associazione con FANS o glucocorticoidi (2).

La prevalenza dell'AR varia tra lo 0,5% e l'1% della popolazione mondiale, con un tasso di incidenza compreso tra 5 e 50 casi ogni 100.000 persone all'anno. L'incidenza presenta un picco nei pazienti di età compresa tra i 35 e i 50 anni. Il rapporto di prevalenza tra i sessi è di 3:1 a favore delle donne. Gli Stati Uniti e i paesi del Nord Europa sono le

aree con la più alta incidenza (3, 4). La situazione in Italia è in linea con i dati degli altri paesi europei con una prevalenza dell'AR dello 0,57%, e l'incidenza è risultata essere più alta anche tra le donne, specialmente tra le pazienti più giovani (5). Secondo gli ultimi dati dell'Organizzazione mondiale della Sanità (OMS) nel 2019, 18 milioni di persone nel mondo vivono con l'AR. Circa il 70% di queste persone sono donne e il 55% ha più di 55 anni. Tra queste ben 3 milioni di persone presentano livelli di gravità (moderata o severa) che potrebbero trarre beneficio dalla riabilitazione.

I fattori di rischio per l'AR possono essere distinti in modificabili e non modificabili. Tra i primi rientrano il basso livello socioeconomico e la vita in aree rurali, mentre tra i non modificabili troviamo etnia, età e sesso. L'AR è una malattia complessa e, per tale motivo, risulta essere influenzata sia da fattori genetici che ambientali (2, 6).

Dal punto di vista genetico, sono stati identificati oltre 100 loci di suscettibilità, molti dei quali coinvolti nella regolazione della risposta immunitaria e in altre malattie autoimmuni. Un ruolo chiave è svolto dai geni del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) di classe II, in particolare DRB1 (HLA-DRB1), con alleli come DRB101, DRB104 e DQ88, che condividono una sequenza amminoacidica chiamata epitopo condiviso. La presenza di quest'ultimo è associata alla produzione di anticorpi anti-peptidi citrullinati (ACPA) e anticorpi anti-fattore reumatoide (FR) (1, 2, 6).

Tra i fattori ambientali figurano alterazioni del microbioma intestinale e orale, infezioni, parodontite e il fumo di sigaretta (7). Recentemente, è stato esplorato il ruolo della dieta nella patogenesi dell'AR, con la dieta mediterranea suggerita come potenziale fattore protettivo (Figura 1) (8). Questo potrebbe spiegare la minore incidenza di AR nel Sud Europa rispetto al Nord Europa e al Nord America (9).

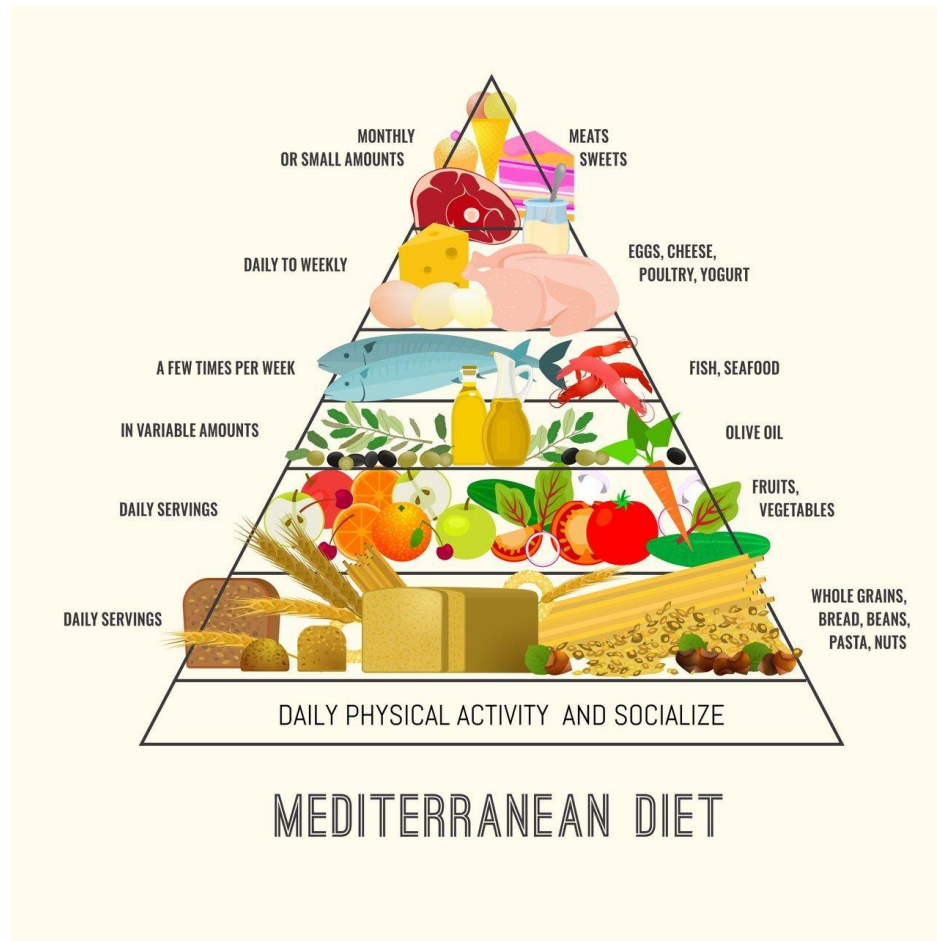


Figura 1. Piramide alimentare della dieta mediterranea.

L'olio extravergine d'oliva (EVOO) in particolare, ricco di polifenoli con proprietà antiossidanti, anti-infiammatorie e antibatteriche potrebbe contribuire alla salute del microbioma intestinale (10). Alimento cardine della dieta mediterranea, l'EVOO, grazie ai suoi composti può assumere un ruolo chiave nella prevenzione dell'AR, così come di tante altre malattie reumatiche infiammatorie (IRDs), e la somministrazione dei principi attivi naturali contenuti nell'EVOO potrebbe inoltre rendere più efficaci gli attuali trattamenti farmacologici per contrastare queste patologie.

1.2. PATOGENESI

L'insorgenza dell'AR è molto complessa e deriva dall'interazione di fattori ambientali, genetici e immunologici che interagiscono tramite vari meccanismi e si manifestano attraverso una varietà diversificata di processi (11). Tra i principali fattori ambientali si annoverano le infezioni virali, come il virus Epstein-Barr (EBV), e quelle batteriche causate da microrganismi come *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* e *Porphyromonas gingivalis*, che possono contribuire all'attivazione di una risposta autoimmune tramite il meccanismo del mimetismo molecolare (7). Questo processo è innescato dalla somiglianza strutturale (a livello amminoacidico) tra antigeni microbici e self (1, 2). Tra i fattori ambientali non microbiologici coinvolti nella patogenesi dell'AR rientra il fumo di sigaretta, il quale sembra agire attraverso molteplici meccanismi, tra cui lo stress ossidativo e l'alterazione dei sistemi di immunità cellulare e umorale (12). Inoltre, diversi studi hanno evidenziato come il *Porphyromonas gingivalis*, responsabile della parodontite, promuova la citrullinazione di alcune proteine self, generando nuovi epitopi (13, 14). Questo altera i meccanismi di tolleranza immunitaria verso queste proteine, portando alla formazione di autoanticorpi (ACPA) (1). Pertanto, la combinazione di predisposizione genetica ed esposizione a fattori di rischio ambientali e casuali rappresenta il principale fattore scatenante del processo patogenetico. A seguito di ciò, i meccanismi dell'immunità innata e acquisita, che si influenzano reciprocamente, sostengono l'infiammazione cronica articolare, causando l'erosione della cartilagine e dell'osso (2).

1.3. RUOLO DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA NELL'INSORGENZA E NELLA PROGRESSIONE DELL'ARTRITE REUMATOIDE

Il sistema immunitario innato svolge un ruolo cruciale sia nell'insorgenza che nella progressione della malattia. Il primo evento scatenante è rappresentato dalla compromissione dei meccanismi di tolleranza immunitaria nei confronti dei neoantigeni citrullinati e degli antigeni self. In particolare, le cellule dendritiche convenzionali localizzate nella sinovia identificano tali antigeni come non-self, probabilmente sotto l'influenza di citochine pro-infiammatorie e chemochine (6). Queste cellule dendritiche fagocitano gli antigeni, li elaborano e successivamente espongono i peptidi derivati sulla loro superficie, associati alle molecole HLA di classe II. In questo modo, le cellule dendritiche agiscono come cellule presentanti l'antigene (APC) negli organi linfoidi secondari, interagendo con il recettore TCR dei linfociti T. Questa interazione promuove la proliferazione e il differenziamento dei linfociti T autoreattivi verso il fenotipo T-helper 1 (Th1) e T-helper 17 (Th17), con conseguente inibizione del differenziamento delle cellule T regolatorie (Treg), normalmente coinvolte nel mantenimento della tolleranza immunitaria (6, 15).

L'attivazione dei linfociti T autoreattivi nell'AR è sostenuta da due meccanismi principali: uno legato alla plasticità cellulare e l'altro associato alle molecole HLA-DRB1. In condizioni normali, la plasticità cellulare consente alle cellule immunitarie di adattarsi a una varietà di minacce esterne. Tuttavia, quando questo processo subisce alterazioni, può favorire lo sviluppo di patologie autoimmuni (16). Le molecole HLA-DRB1, espresse sulla superficie delle cellule macrofagiche, giocano un ruolo cruciale nell'attivazione delle cellule T nell'AR (17, 18). Questi alleli HLA contengono una specifica sequenza amminoacidica, nota come menzionato prima "epitopo condiviso",

che facilita il legame con antigeni citrullinati non-self, innescando così la risposta autoimmune.

L'implicazione dei linfociti Th1 nella patogenesi dell'AR è stata riconosciuta sin dai primi studi (19). Attraverso la secrezione di citochine come IL-2, IFN- γ e TNF- β , i linfociti Th1 attivano i linfociti B e stimolano l'azione dei macrofagi a livello sinoviale. Questo processo amplifica la risposta infiammatoria, portando progressivamente alla degenerazione della cartilagine e all'erosione ossea (20).

Per quanto riguarda i linfociti Th17, si distinguono due sottotipi: i "patogenetici" e i "non patogenetici". I Th17 patogenetici sono considerati attualmente i principali mediatori dell'autoimmunità nell'AR, mentre i Th17 non patogenetici svolgono un ruolo immunosoppressivo attraverso la produzione di IL-10, promuovendo la differenziazione delle cellule Treg e potenziando la loro funzione immunosoppressiva (21-24). La presenza di linfociti Th17 IL-10⁺ nel sangue periferico dei pazienti con AR suggerisce che possano contribuire a modulare la risposta infiammatoria nelle fasi iniziali della malattia (23). I Th17 patogenetici, invece, producono citochine come IL-17A, IL-17F e IL-22 (o GM-CSF), aggravando l'infiammazione articolare (6). L'IL-17 stimola ulteriormente la produzione di citochine e chemochine, reclutando cellule dell'immunità innata e perpetuando il processo infiammatorio su più fronti (25-27). Infine, il GM-CSF promuove la migrazione e l'attivazione delle cellule mieloidi, in particolare dei macrofagi, e stimola la produzione di citochine da parte dei fibroblasti sinoviali (28).

I linfociti B, invece, attraverso il cross-talk con i linfociti T, si attivano e si differenziano in plasmacellule secernenti autoanticorpi, come il FR e gli ACPA. La presenza di questi autoanticorpi identifica i pazienti come "sieropositivi" (29). Gli ACPA

possono appartenere alle classi IgM, IgG o IgA e, a differenza del FR, presentano una specificità per l'AR che varia tra l'85% e il 99% (2, 30). Il loro ruolo patogenetico è variegato e include diversi processi quali l'attivazione diretta dei macrofagi attraverso il legame con i recettori Fc (FcR) presenti sui macrofagi; la formazione di immunocomplessi che si legano ai toll-like receptors (TLR) dei macrofagi, attivandoli indirettamente e promuovendo il rilascio di citochine pro-infiammatorie come il TNF- α ; l'attivazione degli osteoclasti mediante le citochine pro-infiammatorie prodotte o attraverso il legame con la vimentina citrullinata di membrana (1, 31, 32).

Il FR è un anticorpo della classe IgM diretto contro la porzione Fc delle IgG. Tuttavia, non è specifico per l'AR, poiché può essere presente in infezioni, patologie tumorali, reumatiche o persino in individui sani (33). La sua funzione principale è l'attivazione dei macrofagi tramite la formazione di immunocomplessi. Uno studio del 2014 ha difatti dimostrato che il complesso FR-IgM aumenta la capacità degli immunocomplessi contenenti ACPA di attivare i macrofagi (34).

1.4. QUADRO CLINICO, DIAGNOSI E TERAPIA DELL'ARTRITE REUMATOIDE

L'AR è una malattia infiammatoria sistemica che colpisce principalmente le articolazioni sinoviali. Tuttavia, i segni e sintomi extra-articolari possono manifestarsi anche nelle fasi iniziali della malattia e sono spesso associati a un decorso più severo e complesso della patologia. Le manifestazioni cliniche si suddividono quindi in due categorie principali: quelle articolari, che riguardano direttamente le articolazioni, e quelle extra-articolari, che coinvolgono altri organi e sistemi, come la pelle, i polmoni, il

cuore e il sistema vascolare, contribuendo ad aggravare il quadro clinico complessivo (35, 36).

A livello articolare in fase iniziale, l'AR colpisce prevalentemente le piccole articolazioni delle estremità superiori e inferiori. Le articolazioni della colonna vertebrale sono solitamente risparmiate, fatta eccezione per quella atlanto-epistrofea. Il processo infiammatorio può coinvolgere anche articolazioni più grandi, tra cui gomiti, spalle, ginocchia e caviglie. In alcuni casi, tuttavia, l'infiammazione può coinvolgere un'unica articolazione grande, rendendo più complessa la diagnosi di AR (37, 38).

Dal punto di vista clinico, il paziente riferisce dolore articolare e rigidità mattutina, descritta come difficoltà nei movimenti che migliora gradualmente con l'attività fisica (37). Le articolazioni coinvolte appaiono gonfie (tumor), con o senza segni evidenti di calore o arrossamento (calor e rubor). Un segno chiave è la perdita della funzione articolare (functio laesa), spesso evidente nel polso, con limitazione dell'estensione, e nelle mani, con ridotta mobilità. Con il progredire del danno articolare, si sviluppano deformità funzionalmente rilevanti.

A livello cutaneo i noduli reumatoidi rappresentano una delle manifestazioni extra-articolari più comuni nei pazienti affetti da AR mentre le manifestazioni e complicanze cardiovascolari rappresentano una delle principali cause di mortalità nei pazienti affetti da malattie reumatiche (39). La presenza di fattori di rischio come fumo, ipertensione, ipercolesterolemia e diabete, combinata con lo stato autoimmune tipico di queste patologie, aumenta significativamente il rischio cardiovascolare, favorendo l'insorgenza di aterosclerosi, pericardite e soprattutto infarto del miocardio. Nei pazienti

con AR, difatti, il rischio di sviluppare eventi ischemici è maggiore, come dimostrato da studi longitudinali e studi di popolazione (35, 40, 41).

La diagnosi di AR è principalmente clinica, poiché non esistono criteri diagnostici definitivi. Tuttavia, i criteri classificativi del 2010 dell'ACR/EULAR (American College of Rheumatology-European League Against Rheumatism) possono essere utili per classificare i pazienti (Tabella 1).

A. Joint involvement	
1 large joint	0
2- 10 large joints	1
1-3 small joints (with or without involvement of large joints)	2
4-10 small joints (with or without involvement of large joints)	3
>10 joints (at least 1 small joint)	5
B. Serology (at least 1 test result is needed for classification)	
Negative RF and negative ACPA	0
Low-positive RF or low-positive ACPA	2
High- positive RF or high-positive ACPA	3
C. Acute-phase reactants (at least 1 test result is needed for classification)	
Normal CPR and normal ESR 0	0
Abnormal CRP 1 or normal ESR 1	1
D. Duration of symptoms	
< 6 weeks	0
≥ 6 weeks	1

Tabella 1. Criteri di classificazione ACR/EULAR del 2010 per l'AR (nei pazienti che presentano almeno un'articolazione con sinovite clinicamente definita - gonfiore -, non meglio spiegata da un'altra malattia).

A livello clinico, il paziente affetto da AR manifesta tipicamente dolore e gonfiore alle piccole articolazioni, accompagnati da rigidità articolare che migliora progressivamente con il movimento nel corso della giornata. Se questi sintomi persistono per più di 6 settimane, ciò suggerisce la presenza di un processo infiammatorio cronico, caratteristico dell'AR. Gli ACPA rivestono un ruolo cruciale nella diagnosi dell' AR, poiché possono essere rilevati nel sangue fino a 10 anni prima dell'esordio dei sintomi clinici della malattia (1). Inoltre, la loro specificità elevata per l'AR li rende un marker diagnostico di grande rilevanza, ed essi sono strettamente associati alla progressione delle alterazioni radiologiche (42). Il FR è presente nel 60-80% dei pazienti con AR, sebbene non sia specifico della malattia; tuttavia, valori elevati di FR IgM (≥ 50 IU/mL) o la presenza del sottotipo IgA, associati a segni clinici, possono orientare la diagnosi. Valori elevati di FR indicano anche un rischio maggiore di erosioni ossee, mentre il sierotipo IgA è correlato a manifestazioni extra-articolari (43). Dal punto di vista laboratoristico vengono misurate le proteine della fase acuta, come la proteina C reattiva (PCR) e la velocità di eritrosedimentazione (VES), per valutare lo stato infiammatorio del paziente.

In particolare, un aumento della PCR è spesso legato a infiammazione acuta, alterazioni sinoviali e progressione della malattia clinica e radiologica (2). Tali esami laboratoristici possono essere eventualmente confermati dall'ecografia delle mani e dei piedi.

Il trattamento dell'AR prevede l'impiego di un'ampia gamma di farmaci terapeutici con differenti proprietà farmacodinamiche, considerando l'eterogeneità patogenetica e clinica della malattia. Questo trattamento deve essere adattato in base a eventuali comorbidità, danni d'organo e al grado di attività della malattia. Oltre all'utilizzo di antinfiammatori non steroidei (FANS) e glucocorticoidi, i farmaci DMARDs

rappresentano il fulcro della terapia (2, 44). L'azione antinfiammatoria dei FANS deriva dalla loro capacità di inibire la sintesi di prostanoidi (come prostaglandine E2, PGD2, PGF2, trombossano A2, e prostacicline) attraverso il blocco delle ciclossigenasi COX-1 e COX-2. Tra i FANS più utilizzati ci sono aspirina, diclofenac e ibuprofene, farmaci di prima scelta per alleviare i sintomi dolorosi nei pazienti con AR e altre artriti infiammatorie. Sebbene i FANS siano efficaci nel ridurre dolore e infiammazione, non prevencono il danno articolare progressivo.

Analogamente ai FANS, i glucocorticoidi sono ampiamente utilizzati nell'AR, ma con una limitata capacità di modificare il decorso della malattia (2). Questi farmaci hanno un potente effetto antinfiammatorio, poiché riducono la produzione di citochine pro-infiammatorie e ciclossigenasi. Tuttavia, i loro effetti collaterali ne limitano l'uso a lungo termine (45).

I farmaci DMARDs costituiscono una classe terapeutica fondamentale per modificare il decorso naturale dell'AR, già dalle sue prime fasi. Essi si suddividono in due grandi categorie farmacologiche: sintetici e biologici. Tra i DMARD sintetici convenzionali figurano il metotrexato (MTX), la leflunomide (LEF) e la sulfasalazina (46).

Secondo le linee guida EULAR, il MTX è considerato il farmaco di prima scelta nel trattamento dell'AR. Questo farmaco, analogo dell'acido folico, agisce principalmente inibendo l'enzima diidrofolato reduttasi (DHFR), che converte l'acido folico in tetraidrofolato (FH4). Il MTX mostra una forte affinità per DHFR, causando una riduzione dei cofattori N5-N10 metilene FH4 e N10 formil-FH4, essenziali per la sintesi purinica e del timidilato. Inoltre, viene trasformato in derivati poliglutammati,

potenziando la sua azione inibitoria nella sintesi dell'acido folico. Il MTX diminuisce anche la produzione di citochine pro-infiammatorie e riduce l'espressione genica delle citochine associate alla risposta Th1 e Th17, favorendo al contempo quelle della risposta Th2 (46-48).

I farmaci biologici utilizzati per il trattamento dell'AR comprendono inibitori del TNF (adalimumab, certolizumab, etanercept, golimumab, infliximab), e inibitori del recettore dell'interleuchina 6 (IL-6R), come sarilumab e tocilizumab.

- **Inibitori del TNF:** Questi farmaci, come adalimumab, certolizumab, etanercept, golimumab e infliximab, svolgono un ruolo cruciale bloccando il TNF- α che stimola la formazione del panno sinoviale, portando all'erosione della cartilagine e dell'osso. Bloccare il TNF- α interrompe questo processo. Gli studi mostrano che i pazienti trattati con inibitori del TNF presentano un'erosione ossea inferiore rispetto a quelli trattati con placebo o solo metotrexato (49).
- **Inibitori dell'IL-6R:** Sarilumab e tocilizumab rientrano in questa categoria (50).
- **Inibitori della co-stimolazione:** Abatacept modula selettivamente i segnali co-stimolatori necessari per attivare i linfociti T tramite le molecole costimolatorie CD80 e CD86 (51).
- **Anti-CD20:** Rituximab, un anticorpo chimerico umano/murino, si lega a CD20, un antigene espresso sulle cellule B, promuovendone la rimozione dal sangue e parzialmente dal midollo osseo e dal tessuto sinoviale. Rituximab 1000 mg ha dimostrato superiorità terapeutica rispetto a MTX in pazienti refrattari al MTX (52, 53). La sua efficacia è stata confermata a 24 settimane e anche in pazienti in cui la terapia anti-TNF non ha avuto successo (54, 55).

Una nuova classe di farmaci è entrata a far parte dell'armamentario terapeutico reumatologico ovvero i **Jak inibitori** (small molecules). Sono farmaci target sintetici capaci di bloccare la trasduzione del segnale intracellulare del pathway mediato dalle proteine JAK-STAT.

La EULAR ha rinnovato nel 2022 i suoi criteri per la gestione terapeutica dell'AR, aggiornando la versione precedente del 2019 (46). Le linee guida EULAR comprendono gli obiettivi terapeutici e un algoritmo per il trattamento dei pazienti affetti da AR.

L'obiettivo principale per ogni paziente con AR è conseguire una remissione duratura o un basso livello di attività della malattia.

1.5. DIETA MEDITERRANEA E OLIO EXTRAVERGINE D'OLIVA

Ad oggi, sebbene il trattamento con DMARD biologici abbia notevolmente migliorato la progressione della malattia, la ricerca si concentra sull'uso terapeutico potenziale di fitocomposti per coadiuvare il trattamento dell'AR, in particolare composti bioattivi in grado di spegnere naturalmente l'infiammazione. Molti di questi composti bioattivi li introduciamo attraverso la cosiddetta dieta mediterranea, ricca di pesce, verdure e EVOO, il quale è naturalmente in grado di ridurre l'infiammazione grazie all'alto contenuto di una vasta gamma di composti bioattivi, inclusi polifenoli come l'idrossitirosolo (HTy), il tirosolo, l'oleocantale e l'oleuropeina, con comprovati effetti antinfiammatori e antiossidanti. I benefici dell'EVOO sono da tempo riconosciuti, ma mentre in passato erano principalmente associati alla sua componente lipidica, in particolare agli acidi oleici, le ricerche più recenti stanno mettendo sempre più in luce il ruolo degli estratti polifenolici da EVOO (PE-EVOOs) (Figura 2) (56, 57).

obesità e ridurre anche l'insorgenza di alcuni tipi di cancro al colon e al seno (58). La dieta mediterranea è da sempre considerata un modello alimentare salutare, caratterizzato principalmente dal consumo di frutta, verdura, pesce e pasta, con l'EVOO come condimento predominante. Il termine "dieta mediterranea" fu coniato per la prima volta negli anni '40 da Ancel Keys, un medico americano che, durante la Seconda Guerra Mondiale, trascorse un lungo periodo nel Cilento. Keys fu il primo a osservare che lo stile alimentare della zona, comune ai Paesi che si affacciano sul Mediterraneo, fosse legato a un minor rischio di malattie cardiovascolari tra le popolazioni locali (59). Questa dieta faceva un largo uso dell'EVOO, a differenza dei regimi alimentari tipici dei Paesi del Nord Europa, dove predominavano grassi saturi come burro e strutto, associati a una maggiore mortalità per malattie cardiovascolari (60, 61). Oggi l'EVOO è universalmente riconosciuto come un alimento salutare, completo e saporito, ricco di nutrienti essenziali e antiossidanti naturali, tanto da essere classificato come un eccellente "functional food" (62).

Nel 1956 Denham Harman presentò la teoria dei radicali liberi, affermando che l'invecchiamento non è dovuto ai processi metabolici naturali del corpo, ma allo stress ossidativo, condizione patologica caratterizzata da un'elevata quantità di radicali liberi, che danneggiano cellule e tessuti. Essa si manifesta quando nell'organismo si crea uno squilibrio tra la produzione e l'eliminazione dei radicali liberi, ossia specie chimiche ossidanti (63).

I radicali liberi, noti anche come Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS), sono molecole contenenti ossigeno chimicamente reattive, prodotte quotidianamente nel nostro organismo attraverso reazioni metaboliche, come l'ossidazione del glucosio per generare ATP nei mitocondri, o dai meccanismi immunitari che combattono virus e batteri. Lo

stress ossidativo si verifica quando vi è un eccesso di radicali liberi, causato da infiammazione cronica, cattiva alimentazione, fumo, inquinamento, esposizione ai raggi UV o carenza di sostanze antiossidanti capaci di neutralizzarli (Figura 3).

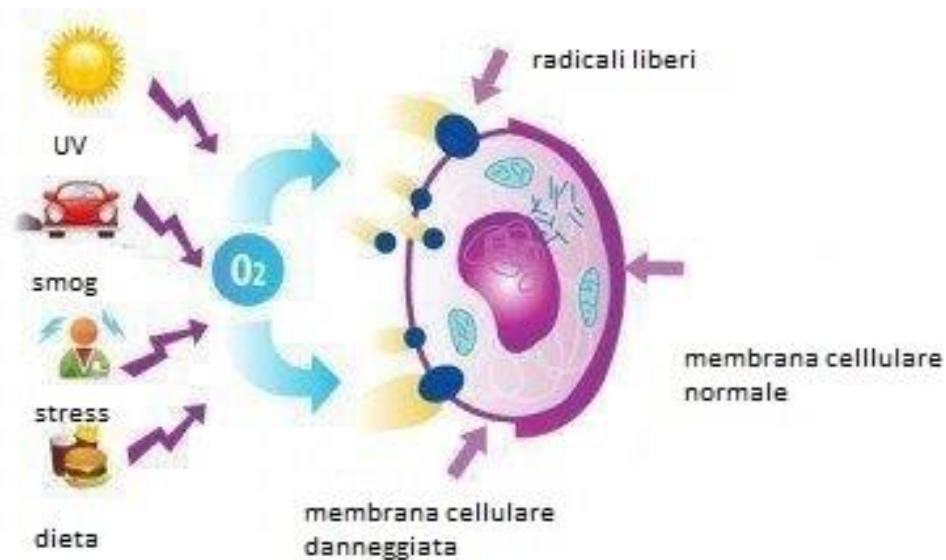


Figura 3. *Fattori esterni scatenanti lo stress ossidativo*

I ROS sono molecole altamente instabili che, per raggiungere la stabilità, devono "prendere in prestito" un elettrone da altre molecole. Questo processo, però, destabilizza a sua volta la molecola donatrice, generando un nuovo radicale libero e innescando una reazione a catena potenzialmente infinita. A interrompere questa reazione intervengono molecole chiamate "antiossidanti", in grado di donare un elettrone senza perdere la propria stabilità.

I ROS comprendono sia radicali liberi che specie non radicaliche. Tra i radicali liberi, troviamo il radicale superossido, il radicale ossidrilico, i radicali alcossilici,

perossidici e il radicale idroperossido. I ROS non radicalici includono, invece, perossido di idrogeno, acido ipocloroso, ossigeno singoletto, ozono e perossidi lipidici (Figura 4).

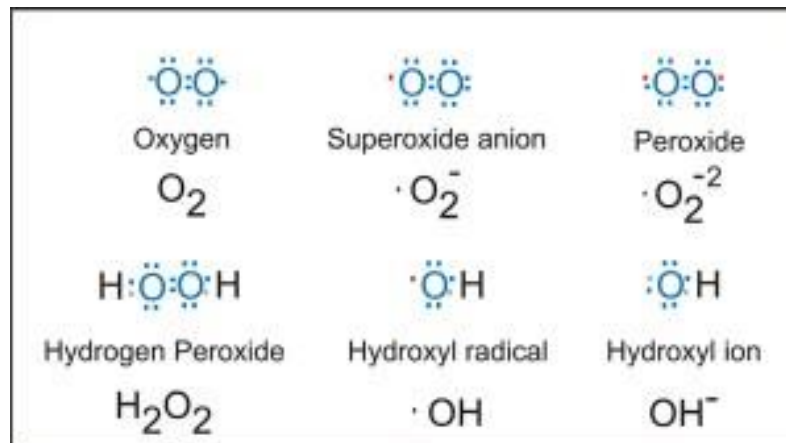


Figura 4. *Tipologie di ROS*

Per placare la loro "fame" di elettroni, i ROS attaccano principalmente le membrane cellulari, ossidando i fosfolipidi e alterandone così la fluidità. Possono inoltre danneggiare proteine, come gli enzimi, e il DNA, causando mutazioni che potrebbero favorire l'insorgenza di tumori. In sostanza, il logoramento cellulare dovuto allo stress ossidativo è alla base di molte patologie gravi, come l'AR, malattie cardiovascolari, diabete, sclerosi multipla, Alzheimer, Parkinson, e alcuni tipi di cancro. La prevenzione si basa, almeno in parte, su sistemi di difesa naturali e l'assunzione di antiossidanti attraverso la dieta, come frutta, verdura e olio d'oliva. L'EVOO, ricco di acido oleico e acido linoleico, aiuta a mantenere l'integrità cellulare e riduce il rischio di malattie legate allo stress ossidativo e all'invecchiamento. I suoi antiossidanti, tra cui fenoli, polifenoli, tocoferoli, squalene e triterpeni, agiscono contro i radicali liberi, proteggendo le membrane cellulari, il DNA e i mitocondri. La ricerca è stata avviata dopo aver osservato

che il consumo di EVOO fresco provoca un pizzicore nella parte posteriore della bocca, simile a quello prodotto dall'assunzione di uno sciroppo contenente ibuprofene, un noto farmaco con proprietà antinfiammatorie, antipiretiche e analgesiche. Questa sensazione è dovuta alla presenza di un composto fenolico chiamato oleocantale, particolarmente interessante per le sue numerose proprietà, tra cui quella antinfiammatoria, spesso paragonata a quella dei FANS (64). Dalla sua scoperta, il numero di studi mirati a individuare nuove applicazioni terapeutiche dei componenti dell'EVOO per diverse patologie è cresciuto notevolmente (65-67).

1.6. COMPOSIZIONE CHIMICA DELL'OLIO EXTRAVERGINE D'OLIVA

L'olio extravergine di oliva rappresenta uno dei simboli principali della dieta mediterranea e uno tra i maggiori responsabili dei benefici per cui essa è da tempo nota. L'EVOO si ottiene dai frutti dell'*Olea europaea L.*, famiglia delle Oleaceae, comunemente detta *ulivo*, e il merito delle sue proprietà benefiche è da attribuire alla sua peculiare composizione.

La composizione chimica degli oli ottenuti dalla lavorazione delle olive varia in base alla categoria commerciale. Le due principali categorie, olio vergine e olio extravergine d'oliva, presentano composizioni chimiche molto simili, ma differenti nelle qualità organolettiche e nella percentuale di acidità data dall'acido oleico. Per l'olio extravergine il limite è fissato a 0,8 grammi di acido oleico per 100 grammi, per l'olio vergine invece il tetto massimo è di 2 grammi per 100 grammi.

La composizione dell'EVOO dipende da diversi fattori, inclusi i metodi di produzione e trasformazione delle olive. Tuttavia, anche il luogo di produzione, con il

suo clima e ambiente specifico, gioca un ruolo cruciale nel determinare la qualità finale dell'olio. Si ritiene che le fasi di maturazione e trasformazione delle olive siano decisive per la qualità del prodotto finale. Per quanto riguarda la composizione chimica, l'olio d'oliva si divide in una frazione “saponificabile”, composta per il 98% da trigliceridi, e una frazione “insaponificabile”, che rappresenta solo il 2%, ma contiene i componenti più rilevanti dal punto di vista nutrizionale (Figura 5).

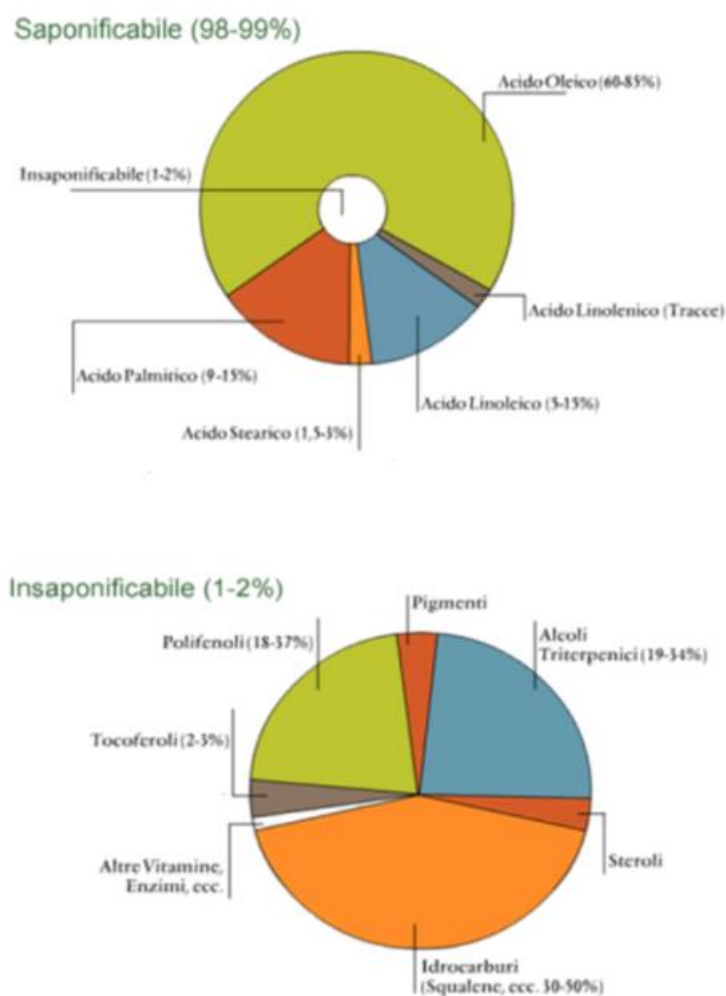


Figura 5. *Composizione chimica dell'EVOO*

La composizione dell'EVOO evidenzia una prevalenza di acidi grassi monoinsaturi e polinsaturi. Si tratta principalmente di trigliceridi, esteri della glicerina

con acidi grassi saturi e insaturi. Tra i saturi, l'acido palmitico e stearico rappresentano circa il 10%, mentre l'acido oleico, un acido grasso monoinsaturo, costituisce il 70% e l'acido linoleico, un polinsaturo, circa il 15%. L'acido oleico, il più abbondante, è fondamentale per mantenere la fluidità delle membrane cellulari e prevenire la perossidazione lipidica. Inoltre, protegge la mucosa gastrica riducendo la secrezione di acido cloridrico e migliorando i sintomi di ulcera; facilita lo svuotamento della cistifellea e inibisce la produzione di bile, aiutando a prevenire i calcoli biliari. Ha anche un effetto lassativo e favorisce l'assorbimento di calcio e vitamine. Il suo alto contenuto di acidi grassi monoinsaturi (MUFA) è legato ai benefici per la salute cardiovascolare, poiché l'acido oleico influisce positivamente sul metabolismo del colesterolo.

Tuttavia, studi recenti hanno dimostrato che l'olio di girasole, pur ricco di acido oleico, non ha gli stessi effetti, suggerendo che altri fattori presenti solo nell'olio d'oliva sono determinanti per questi benefici (68-70). Questi fattori sono noti come “componenti minori”, circa 230 sostanze che formano la frazione insaponificabile. In essa troviamo idrocarburi olefinici, tocoferoli, alcoli alifatici e triterpenici, steroli, vitamine, pigmenti, oltre a piccole quantità di cere, fosfolipidi, aldeidi e chetoni. Tra gli idrocarburi, il più abbondante è lo squalene (circa 400 mg/kg), un precursore nella sintesi del colesterolo e degli ormoni steroidei. La sua rilevanza sta nella capacità di proteggere contro l'ossidazione indotta dalla luce, prevenendo l'invecchiamento cellulare; inoltre, riduce l'ossidazione delle LDL nel sangue e inibisce l'assorbimento intestinale del colesterolo, riducendone anche la produzione nel plasma. I tocoferoli, precursori della vitamina E, sono presenti in concentrazioni tra 100 e 250 mg/kg, e si suddividono in tocotrieni (α , β , γ , δ , chiamati vitamina T) e tocoferoli (α , β , γ , δ , vitamina E). L' α -tocoferolo costituisce circa il 90% dei tocoferoli ed è il più potente antiossidante, capace di prevenire la

perossidazione dei grassi polinsaturi e l'irrancidimento dell'olio. I pigmenti, come clorofilla e carotenoidi (luteina e β -carotene), influenzano la colorazione dell'olio e proteggono dall'ossidazione in assenza di luce (71, 72).

Gli steroli rivestono un ruolo fondamentale nel garantire l'autenticità e l'elevata qualità dell'olio d'oliva. Sono presenti in quantità rilevanti, oltre 1600 mg/kg, e agiscono come precursori del colesterolo, tra i quali il più significativo è il β -sitosterolo, seguito da campesterolo e stigmasterolo. Nella frazione insaponificabile troviamo anche alcoli alifatici e triterpenici, elementi cruciali per identificare gli oli ottenuti tramite pressione meccanica o estrazione con solvente. Tra questi, il cicloartenolo è noto per favorire l'eliminazione del colesterolo attraverso l'aumento della secrezione degli acidi biliari. Eritrodiolo e uvaolo, presenti nella buccia della drupa, mostrano proprietà antinfiammatorie, antiossidanti, cardiotoniche e vasodilatatorie (73).

Infine, troviamo i fosfolipidi e i composti fenolici. I fosfolipidi possono supportare l'azione antiossidante di alcune vitamine, favorendo la rigenerazione della loro struttura molecolare. I composti fenolici polari (polifenoli) sono potenti antiossidanti e scavenger di radicali liberi, in grado di proteggere l'olio dall'ossidazione e, quindi, dall'irrancidimento. Questa capacità inibitoria è attribuita alla loro struttura chimica, che presenta un gruppo ossidrile legato direttamente a un anello benzenico. Questi composti possono avere una parte polare e una apolare, e si suddividono principalmente in:

acidi e alcoli fenolici, derivati dell'acido benzoico, lignani, flavonoidi e secoiridoidi.

Tra gli acidi fenolici, i primi osservati nell'olio d'oliva includono gli acidi idrossibenzoici, come l'acido gallico e protocatecuico, e gli acidi idrossicinnamici, come l'acido caffeico e vanillico. Gli alcoli fenolici più abbondanti sono l'idrossitirosolo e il

tirosolo, potenti antiossidanti presenti soprattutto nelle foglie di *Olea europaea*, spesso eliminati nelle acque di vegetazione. L'idrossitirosolo, sia libero che esterificato, si trova nelle olive e nell'olio EVO, e la sua concentrazione aumenta durante la maturazione del frutto, diventando un indicatore del grado di maturazione delle olive (56). Negli ultimi anni, sono stati identificati diversi flavonoidi, tra cui l'apigenina e la luteolina, e lignani, in particolare il (+)-1-acetossipinoresinolo, il (+)-1-pinoresinolo e il (+)-1-idrossipinoresinolo, riconosciuti come potenti antiossidanti. Questi composti svolgono anche un'importante funzione protettiva contro i tumori al seno, colon e prostata. Il (+)-pinoresinolo è un componente comune dei lignani presenti in varie piante, come il sesamo (*Sesamum indicum*) e i semi di *Forsythia*, della famiglia delle Oleaceae. È stato individuato anche nel nocciolo delle olive. Il (+)-1-acetossipinoresinolo, il (+)-1-idrossipinoresinolo e i loro glicosidi sono stati rilevati nella corteccia dell'olivo (*Olea europaea*). Tuttavia, i lignani non sono presenti nel pericarpo delle drupe né nei rami o foglie che possono accidentalmente essere pressati insieme alle olive. Pertanto, il loro trasferimento nell'olio, dove costituiscono una delle frazioni fenoliche più importanti, rimane ancora poco chiaro. Il (+)-1-acetossipinoresinolo e il (+)-pinoresinolo non si trovano negli oli di semi e sono praticamente assenti negli oli di oliva vergini raffinati, mentre nell'olio extravergine di oliva possono raggiungere concentrazioni fino a 100 mg/kg. Come per i fenoli semplici e i secoiridoidi, vi è una significativa variabilità nella concentrazione dei lignani tra i vari oli di oliva, probabilmente dovuta alle differenze nelle aree di coltivazione, nel clima, nelle varietà di olive e nelle tecniche di produzione.

Inoltre, analisi più approfondite hanno identificato i secoiridoidi, che si trovano sia in forma glicosilata (oleuropeina, dimetiloleuropeina e ligstroside) sia in forma agliconica (agliconi di oleuropeina e ligstroside), oltre che in forma dialdeica con apertura

dell'anello dell'acido elenolico (oleaceina e oleocantale). Questi sono tra i polifenoli più complessi dell'olio d'oliva, derivati dal metabolismo secondario dei terpeni. A differenza di tocoferoli, flavonoidi e acidi e alcoli fenolici, che si trovano in molte piante di famiglie botaniche diverse, i secoiridoidi sono presenti esclusivamente nelle piante della famiglia delle Oleaceae (74).

I PE-EVOOs si trovano prevalentemente in forma di agliconi, ovvero molecole prive della parte zuccherina. Questa forma deriva dalla rimozione del gruppo glicosidico, processo effettuato dalle glicosidasi durante la spremitura delle olive, che contengono i polifenoli stessi. La classificazione dei polifenoli (PE) è basata proprio sulla struttura degli agliconi, e come menzionato sopra si distingue in: acidi fenolici, flavonoidi, amidi polifenolici e altri polifenoli. Tra i composti polifenolici più abbondanti nell'EVOO spiccano l'**oleocantale** (responsabile della sensazione pungente o di bruciore alla gola che si avverte durante la degustazione di olio extravergine di alta qualità simile all'effetto dell'ibuprofene dove oleo sta per olio, cant sta per pizzicore e ale per aldeide) e l'**oleuropeina** (OLE, sapore amaro caratteristico, responsabile in parte dell'amarezza delle olive fresche e dell'olio extravergine di oliva) e i suoi derivati, insieme a fenoli semplici come tirosolo, idrossitirosolo e verbascoside (Figura 6).

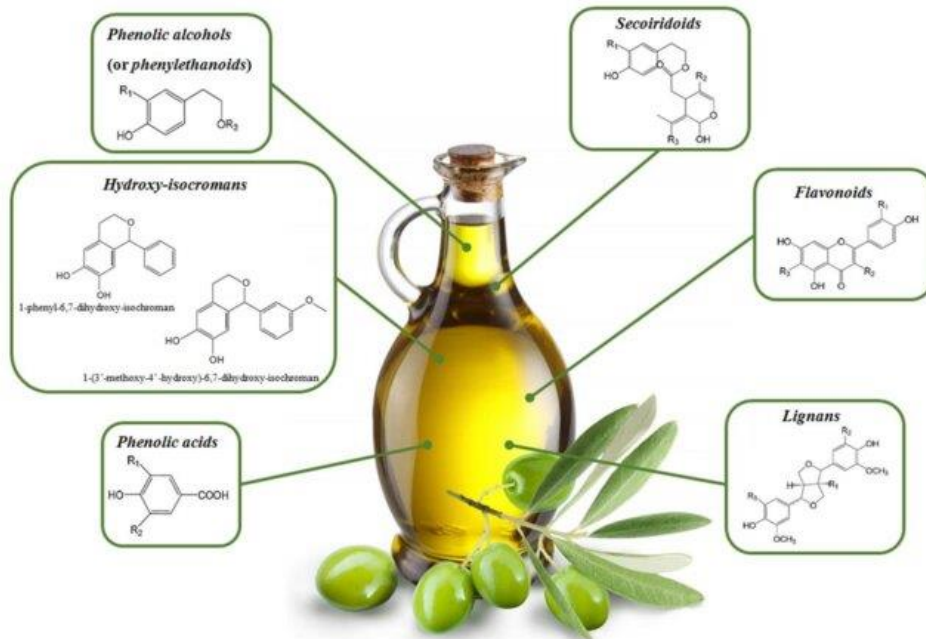


Figura 6. *Composti fenolici più comuni dell'EVOO*

L'assunzione dei PE avviene per via orale principalmente attraverso il consumo di EVOO. Il loro assorbimento avviene principalmente nell'intestino, dopodiché i PE vengono metabolizzati nel fegato tramite le reazioni di fase I e II, producendo derivati metilati, idrossilati, coniugati con tioli, derivati glucuronati e altri metaboliti. Questi processi alterano la struttura chimica dei PE, ma non è ancora del tutto chiaro se tali modificazioni conferiscano nuove attività biologiche. Tuttavia, il limitato assorbimento intestinale porta a una scarsa biodisponibilità (56, 75).

Numerosi studi hanno evidenziato che l'EVOO possiede proprietà antiossidanti, antinfiammatorie, immunomodulanti, antiproliferative e antiapoptotiche. Recenti ricerche su modelli animali suggeriscono che gli effetti antinfiammatori e antiossidanti siano attribuibili principalmente ai PE piuttosto che alla frazione lipidica dell'olio (76, 77).

- **Proprietà antiossidanti:** Lo stress ossidativo, causato dalla produzione di ROS e dall'alterazione dei meccanismi antiossidanti naturali dell'organismo, è alla base di numerose patologie. A livello molecolare, l'oleuropeina (OLE) agisce come "scavenger" dei radicali liberi e inibisce l'ossidazione delle LDL (lipoproteine a bassa densità) indotta dal solfato di rame (56, 78).
- **Proprietà antinfiammatorie:** In modelli sperimentali di artrite indotta nei topi, l'assunzione di PE ha mostrato un'attività protettiva contro il danno infiammatorio a livello articolare, agendo principalmente attraverso l'inibizione della trasduzione del segnale mediata dalle proteine MAPK (Mitogen-activated protein kinase) e da NF- κ B (Nuclear Factor kappa B) nel tessuto sinoviale, oltre a ridurre l'espressione di citochine pro-infiammatorie come TNF- α e IL-1 β , delle ciclossigenasi di tipo 2 (COX-2) e della prostaglandina E2 (PGE2) (76, 79).

Queste proprietà antinfiammatorie sono state studiate dettagliatamente negli anni mettendo a confronto l'oleocantale e l'ibuprofene. Essi, pur avendo strutture chimiche diverse, condividono la capacità di inibire gli enzimi COX-1 e COX-2, coinvolti nella biosintesi delle prostaglandine, molecole che esercitano diversi effetti su vasi sanguigni, terminazioni nervose e cellule infiammatorie. Questo processo è strettamente legato al danno tissutale e all'infiammazione, che si manifesta a livello della membrana cellulare con il rilascio di enzimi lisosomiali e, successivamente, dell'acido arachidonico dai fosfolipidi, da cui derivano gli eicosanoidi. Questi ultimi sono prodotti dall'ossidazione degli acidi grassi polinsaturi a lunga catena, e l'acido arachidonico è il precursore principale. Dopo la sua mobilitazione, l'acido arachidonico viene ossidato attraverso quattro vie biochimiche principali:

- Ciclossigenasi (COX)

- Lipossigenasi
- Epoxygenasi del citocromo P450
- Via degli isoprostani

La produzione specifica di eicosanoidi dipende da vari fattori, come la specie, il tipo di cellula, il suo fenotipo, lo stimolo ricevuto e la natura dell'acido polinsaturo esterificato nei fosfolipidi di membrana. Di particolare interesse è la sintesi degli eicosanoidi attraverso la via della COX. Esistono due isoforme della ciclossigenasi, COX-1 e COX-2, che convertono l'acido arachidonico in prostaglandine. La COX-1 è costitutivamente espressa, mentre la COX-2 è inducibile e la sua espressione varia a seconda degli stimoli. Entrambe rappresentano il bersaglio principale dei FANS. Beauchamp e colleghi hanno dimostrato che l'oleocantale inibisce entrambi gli enzimi in maniera dose-dipendente, riproducendo l'azione antinfiammatoria dell'ibuprofene sintetico (64, 80). Gli studi di Beauchamp e colleghi hanno evidenziato che l'oleocantale non solo replica il meccanismo antinfiammatorio dell'ibuprofene, ma inibisce in modo più efficace gli enzimi COX-1 e COX-2 a concentrazioni equimolari (Figura 7). Alla concentrazione di 25 mM, l'oleocantale inibisce l'attività delle COX tra il 41% e il 57%, rispetto all'ibuprofene che raggiunge un'inibizione del 13-18%. Se un individuo consuma quotidianamente 50 grammi di olio d'oliva contenenti circa 200 mg/ml di oleocantale, con un'assorbimento stimato al 70%, l'assunzione totale di oleocantale è di circa 9 mg al giorno. Questa dose, sebbene bassa, rappresenta circa il 10% del dosaggio di ibuprofene raccomandato per alleviare il dolore in un adulto (64, 80).

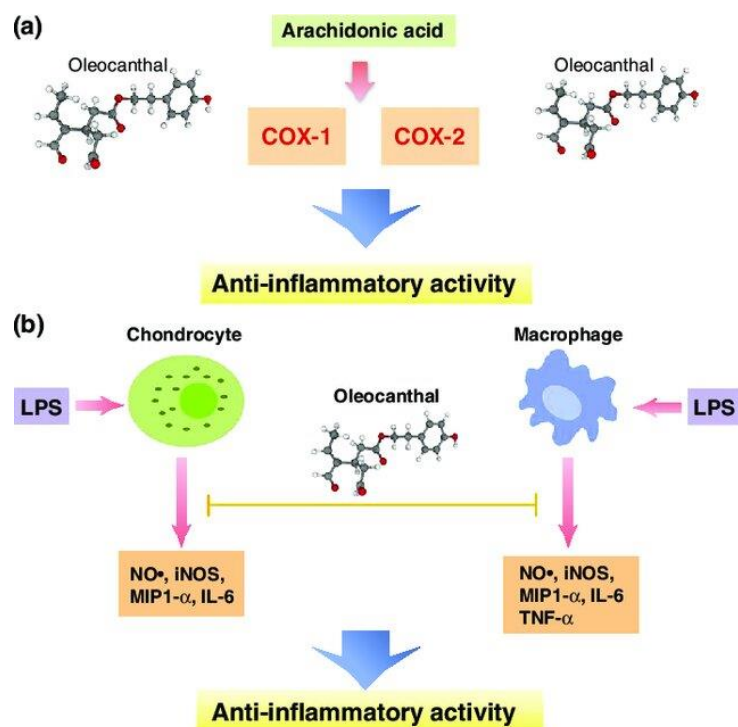


Figura 7. Attività antinfiammatorie dell'Oleocantale

Nei macrofagi, l'attività antinfiammatoria dell'oleocantale si manifesta attraverso l'inibizione della produzione di NO tramite la downregulation di iNOS, oltre alla riduzione di citochine pro-infiammatorie come IL-1 β e TNF- α . Questi mediatori hanno un ruolo cruciale nelle malattie articolari infiammatorie e degenerative, come l'osteoartrosi e l'AR. Pertanto, l'oleocantale non solo inibisce l'infiammazione a livello della cartilagine, ma agisce anche sulla cascata infiammatoria nelle cellule sinoviali.

Complessivamente, questi risultati suggeriscono che l'oleocantale, così come gli altri polifenoli contenuti nell'EVOO, potrebbe essere un promettente agente terapeutico per il trattamento delle malattie degenerative delle articolazioni (81).

2. OBIETTIVO DELLO STUDIO

L'obiettivo del mio studio è stato appunto cercare di dimostrare i benefici effetti anti-infiammatori dei PE-EVOOs. Pertanto, abbiamo incubato cellule linfocitarie e monocitarie del sangue periferico (PBMCs) ottenute da pazienti affetti da AR e da soggetti sani, stimulate con lipopolisaccaride (LPS), con polifenoli estratti mediante centrifugazioni ripetute in etanolo da un olio extravergine di oliva siciliano dell'Azienda Agricola Signorello, situata a Campobello di Mazara, al fine di indagare i meccanismi molecolari alla base dell'effetto antiossidante e anti-infiammatorio dei PE-EVOOs in tali cellule. In particolare, abbiamo valutato gli effetti protettivi dei PE-EVOOs valutandone l'attività di scavenging dei ROS e la capacità di modulare la produzione di citochine pro-infiammatorie prodotte dalle PBMCs di pazienti con AR, al fine di potere suggerire un loro utilizzo a scopo terapeutico.

3. MATERIALI E METODI

3.1. ESTRAZIONE CHIMICA DEI POLIFENOLI DA OLIO EXTRAVERGINE D'OLIVA E SUCCESSIVA CARATTERIZZAZIONE TRAMITE CROMATOGRAFIA LIQUIDA E SPETTROMETRIA DI MASSA (HPLC/MS)

Gli estratti arricchiti in polifenoli da olio extra vergine di oliva sono stati ottenuti tramite centrifugazioni ripetute in una miscela contenente etanolo e acqua in un rapporto di 8:2, insieme a esano in un rapporto 1:1 con la quantità iniziale di EVOO. Successivamente, il contenuto di polifenoli estratti è stato determinato misurando la quantità equivalente di acido gallico, uno dei polifenoli più rappresentativi nell'EVOO, utilizzando il protocollo Folin-Ciocalteu. Per eliminare l'etanolo, potenzialmente tossico per le cellule, è stato utilizzato un processo di liofilizzazione, e il prodotto ottenuto è stato risospeso in dimetilsolfossido (DMSO) ad un'appropriata concentrazione. L'analisi HPLC/MS è stata effettuata dopo liofilizzazione dai colleghi del Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche dell'Università degli Studi di Palermo, secondo i metodi utilizzati in laboratorio (82, 83).

3.2. RECLUTAMENTO PAZIENTI

Per il nostro studio abbiamo reclutato un totale di 40 Soggetti con AR Naive provenienti dalla UO di Reumatologia del Policlinico Universitario "Paolo Giaccone" di Palermo, 15 dei quali utilizzati per studi di citofluorimetria, altri 15 per valutare la produzione di ROS e i restanti 10 per esperimenti di Western Blot. Tutti i pazienti reclutati soddisfacevano i criteri di classificazione ACR/EULAR 2010 per l'AR, presentavano malattia attiva e non avevano mai ricevuto trattamenti con DMARDs. I pazienti erano

stati precedentemente trattati con una dose stabile di FANS. Sono stati inoltre arruolati come controlli 15 donatori sani (HD) appaiati per età e sesso.

Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico locale dell'Università di Palermo e ha rispettato le disposizioni della Dichiarazione di Helsinki ed è stato ottenuto il consenso informato da ciascun paziente e da ciascun controllo, protocollo etico n° 08.2021 del 09/15/2021.

3.3. SAGGIO DI VITALITA'

Il saggio MTS (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, MTS, Promega Corporation, Madison, WI, USA) è stato utilizzato per valutare l'attività metabolica e la vitalità delle PBMCs dopo il trattamento con diverse dosi di PE-EVOOs. Il test colorimetrico consiste nella conversione del sale tetrazolio MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carbossimetossifenil)-2-(4-sulfopenil)-2H-tetrazolio) in formazano viola in presenza di metosolfato di fenazina. Gli enzimi responsabili di questa reazione sono le deidrogenasi dipendenti da NADPH, attive solo nelle cellule vitali.

L'assorbanza della soluzione di formazano risultante è proporzionale al numero di cellule vitali e può essere quantificata mediante spettrofotometria (assorbanza misurata a 490–500 nm). A tal fine, le PBMCs di soggetti sani sono state incubate in piastre da 96 pozzetti (100x10³ cellule/pozzetto/100 µl) per 48 ore con diverse dosi (1-50 µg/mL) di PE-EVOOs siciliani, quindi in ogni pozzetto sono stati aggiunti 20 µl di soluzione MTS (concentrazione finale di MTS pari a 0,33 mg/ml), incubando da 1 a 4 ore a 37°C. L'assorbanza è stata infine registrata a 490 nm.

3.4. ATTIVITA' DI RADICAL SCAVENGING

Diverse quantità di PE-EVOOs (1-50 µg/mL) sono state aggiunte a una soluzione etanolica di 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (100 µM) in un volume finale di 1 ml. Ogni quantità di PE-EVOO è stata incubata al buio a temperatura ambiente per 30 minuti. La riduzione dell'assorbanza è stata misurata spettrofotometricamente a 517 nm.

I radicali DPPH presentano un'assorbanza massima a 517 nm, e il picco scompare in seguito alla riduzione da parte di un composto antiossidante. Parallelamente, è stato preparato un controllo negativo (A0) con la soluzione etanolica di DPPH, mentre un campione bianco (A2) contenente solo etanolo è stato utilizzato come riferimento.

L'attività di scavenging radicalico (% di inibizione del radicale DPPH) è stata calcolata utilizzando la seguente equazione.

$$\text{Inibizione (\%)} = 1 - (A1 - A2/A0 - A2) \times 100$$

3.5. ISOLAMENTO PBMCs, MARCATURA INTRACELLULARE E ANALISI CITOFUORIMETRICA

I campioni di sangue periferico sono stati ottenuti da soggetti sani (HS) e pazienti con AR mediante venipuntura e raccolti in provette contenenti acido etilendiamminotetraacetico (EDTA). Le PBMCs sono state isolate dai pazienti con AR tramite centrifugazione su gradiente di densità. Il sangue venoso è stato diluito in rapporto 1:2 con PBS e centrifugato su un gradiente di Ficoll (Lympholyte per separazione cellulare umana, Cederlane, Canada) in una provetta conica di polistirene da 15 mL per 20 minuti a 770×g a temperatura ambiente (RT). Successivamente, le PBMCs sono state

accuratamente aspirate dall'interfaccia plasma-Ficoll e lavate due volte (a 500×g per 5 minuti) con terreno RPMI 1640 fresco (con un supplemento di 20 mM HEPES, 100 U/mL penicillina e 100 µg/mL streptomina). Infine, le PBMCs sono state risospese in 1 mL di RPMI completo (contenente 10% di FCS inattivato e 2 mM L-glutamina) in una provetta conica da 15 mL.

Dopo la separazione su gradiente di Ficoll-Hypaque, le PBMCs isolate dai pazienti con AR sono state coltivate in terreno completo (RPMI 1640 Euroclone) da sole o in presenza di 10 µg/mL di PE-EVOO per 48 ore. Dopo le prime 24 ore di trattamento con PE-EVOO, alle PBMCs degli HS è stato aggiunto lipopolisaccaride (LPS, Sigma-Aldrich) a 5 µg/mL, coltivandoli in RPMI completo da soli o in presenza di PE-EVOO (10 µg/mL). Inoltre, Monensina a 10 µg/mL (BioLegend) è stata aggiunta a tutte le condizioni dopo la prima ora di incubazione come bloccante del Golgi. Al termine del periodo di incubazione, le PBMCs sono state marcate con il kit Zombie NIR Fixable Viability (BioLegend 423106) per valutare la loro vitalità e con anticorpi monoclonali (mAb) specifici per molecole di superficie come CD3, CD4 e CD14 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germania). Dopo il rilevamento delle molecole di superficie, le PBMCs sono state fissate, permeabilizzate (Inside Stain Kit, Miltenyi Biotec) e incubate con mAb diretti contro TNF- α e IL-1 β (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germania).

La scelta dei reagenti della stessa azienda è stata fatta per garantire la standardizzazione analitica e facilitare la comparabilità dei risultati. L'acquisizione citofluorimetrica delle PBMCs marcate è stata effettuata utilizzando il citofluorimetro FACS Lyric (BD Biosciences), acquisendo un minimo di 200.000 eventi totali.

Successivamente, l'analisi del campione è stata eseguita con il software FlowJo (Treestar Inc., Ashland, OR).

3.6. ESPRESSIONE INTRACELLULARE DELLE SPECIE REATTIVE DELL'OSSIGENO

I livelli intracellulari delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono stati valutati quantificando l'ossidazione della sonda permeabile 2',7'-diclorodididrofluoresceina diacetato (H2DCFDA; Molecular Probe, Life Technologies, Eugene, OR, USA). Le PBMCs ottenute da pazienti con AR e da HS sono state trattate come per l'analisi citofluorimetrica, ma in assenza del bloccante di Golgi Monensina. Successivamente, le cellule sono state risciacquate con PBS e incubate al buio a 37 °C con il 5% di CO₂, in presenza della sonda H2DCFDA a 1 mM per 10 minuti e 0,5 µM per 5 minuti. Dopo l'incubazione, il fluorocromo in eccesso è stato rimosso mediante lavaggi con PBS, e la fluorescenza intracellulare prodotta, rappresentata dalla 2',7'-diclorofluoresceina (DCF) derivante dall'ossidazione, è stata quantificata utilizzando saggi citofluorimetrici. Questi saggi impiegano lunghezze d'onda di eccitazione ed emissione adatte per rilevare la fluoresceina, utilizzando un filtro FITC con lunghezza d'onda di eccitazione di 488 nm e lunghezza d'onda di emissione di 530 nm.

3.7. ANALISI WESTERN BLOT

A seguito del trattamento con LPS e/o PE-EVOO, le cellule sono state lavate in PBS e successivamente lisate a 4°C per 30 minuti in un buffer di lisi ghiacciato contenente 1% NP-40, 0,1% SDS e 0,5% di deossicolato di sodio in PBS, integrato con un cocktail

di inibitori delle proteasi. Il lisato è stato poi sottoposto a sonificazione con tre impulsi di 10 secondi ciascuno. La concentrazione proteica è stata determinata utilizzando il saggio proteico di Bradford (Bio-Rad Laboratories S.r.l., Segrate, Milano, Italia).

Successivamente, una quantità equivalente di proteine (30 µg/lane) è stata caricata e sottoposta ad elettroforesi su gel di poliacrilammide contenente sodio dodecilsolfato (SDS-PAGE). Le proteine sono state infine trasferite dal gel a una membrana di nitrocellulosa attraverso blotting elettroforetico (Bio-Rad).

L'immunorilevazione è stata effettuata incubando le membrane con anticorpi primari specifici, tra cui pNF-kB p65 (Ser536, 93H1, Cell Signaling (Danvers, MA, USA), pNRF2 [pSer40] (NBP2-67465), NRF2 (NBP1-32822, Novus Biologicals Bio-Techne SRL, Milan, Italy), MnSOD (sc-133254), catalasi (sc-271358), NF-kB (sc-8008), COX-2 (sc-7951), acquistati da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Infine, i segnali immunoreattivi, sviluppati utilizzando anticorpi secondari coniugati con HRP (Amersham, GE Healthcare Life Science, Milano, Italia), sono stati visualizzati con reagenti per chemiluminescenza potenziata (ECL, Cyanagen, Bologna, Italia) e catturati con ChemiDoc XRS (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). La quantificazione del segnale è stata eseguita utilizzando il software Quantity One 1-D, mentre l'intensità della proteina di interesse è stata quantificata mediante analisi densitometrica utilizzando il software SMX Image (Bio-Rad Laboratories S.r.l., Segrate, Italia). Infine l'intensità della proteina di interesse è stata quantificata tramite analisi densitometrica utilizzando il software SMX Image (Bio-Rad Laboratories Srl, Segrate, Italia).

3.8. ANALISI STATISTICA

I dati sono stati analizzati utilizzando GraphPad Prism, versione 9.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). È stato eseguito il test t di Student non parametrico per confrontare la media della produzione di citochine e il conteggio assoluto delle cellule linfomonocitarie tra le diverse condizioni. Per ogni test è stato considerato statisticamente significativo un *p-value* ≤ 0.05 .

4. RISULTATI

4.1. CARATTERIZZAZIONE DEI COMPOSTI FITOCHIMICI PRESENTI NEGLI ESTRATTI ARRICCHITI IN PE-EVOOs

Per identificare e quantificare i composti naturali bioattivi eventualmente presenti nei nostri PE-EVOOs, è stata eseguita una caratterizzazione completa attraverso HPLC-ESI-MS al fine di chiarire il loro possibile coinvolgimento nell'attività antinfiammatoria e antiossidante. L'analisi HPLC-ESI-MS dei PE-EVOOs ha evidenziato la presenza di 13 diversi composti polari, presunti responsabili degli effetti benefici del nostro olio siciliano (Tabella 2).

Composto	Formula molecolare	Classe di metaboliti
Idrossitirosole 4-glucoside	C ₁₄ H ₂₀ O ₈	Composto fenolico
Oleuropeina aglicone	C ₁₉ H ₂₂ O ₈	Secoiridoide
5,6'-Diidrossi-6,7-dimetossiflavone-2'-O-glucoside	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₂	Flavonoide
Acido deossigeniposidico	C ₁₆ H ₂₂ O ₉	Glucoside iridoide
Eptanoato di diidrossifeniletile	C ₁₅ H ₂₂ O ₄	Composto fenolico
Gallato di decile	C ₁₇ H ₂₆ O ₅	Composto fenolico

Gingerolo	C ₁₇ H ₂₆ O ₄	Composto fenolico
Olean-12-ene-3,7,15,21,23,28-esolo	C ₃₀ H ₅₀ O ₆	Triterpenoide
Linoleil idrossitirosolo	C ₂₆ H ₄₀ O ₄	Composto fenolico
Palmitoilidrossitirosolo	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	Composto fenolico
Oleil idrossitirosolo	C ₂₆ H ₄₂ O ₄	Composto fenolico
Oleanene-tetrolo	C ₃₀ H ₅₀ O ₄	Triterpenoide
Isomero palmitoilidrossitirosolo	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	Composto fenolico

Tabella 2. *Principali composti presenti nei nostri PE-EVOOs*

4.2. EFFETTI DEI PE-EVOOs SULLA VITALITA' CELLULARE

Per escludere eventuali effetti citotossici dei nostri PE-EVOOs, PBMCs ottenute da soggetti sani (HS) sono state utilizzate per determinare le concentrazioni non tossiche tramite saggi MTS. A tal fine, abbiamo valutato l'effetto sulla vitalità cellulare di un trattamento di 48 ore con diverse dosi (0,5-50 µg/mL) di PE-EVOOs. I risultati riportati indicano che la citotossicità dei PE-EVOOs è dose-dipendente, con una tossicità quasi assente fino alla concentrazione di 25 µg/mL, dose che determina il 33% di citotossicità (Figura 8). Sulla base di questi dati, abbiamo ulteriormente indagato la concentrazione ottimale da utilizzare per esperimenti successivi, anche in termini di attività di scavenging dei radicali liberi.

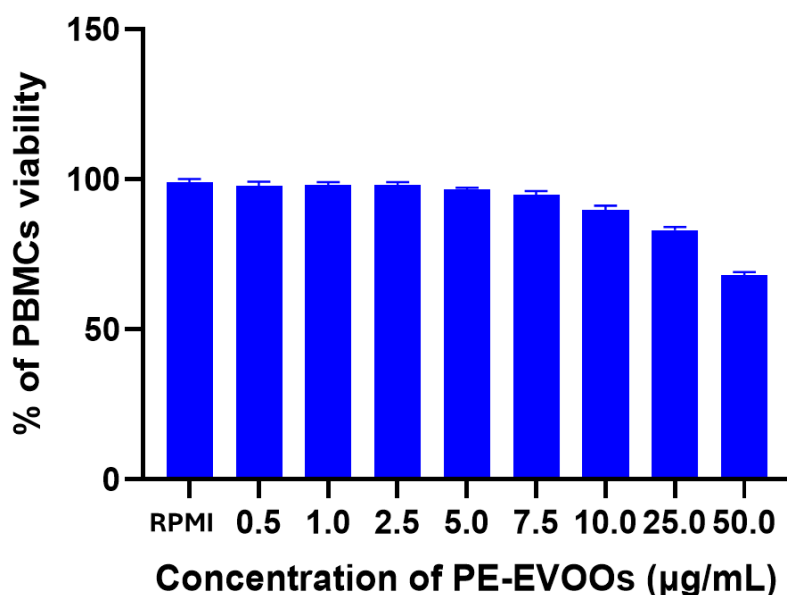


Figura 8. Effetti dei PE-EVOOs sulla vitalità cellulare. Le PBMCs ($100 \times 10^3/100 \mu\text{L/well}$) sono state incubate con diverse dosi (0,5-50 $\mu\text{g/mL}$) di PE-EVOOs per 48 ore. Successivamente, è stata valutata la percentuale di cellule vitali mediante il saggio colorimetrico MTS. I valori riportati rappresentano la media \pm SD di tre esperimenti indipendenti; * *p*-value summary < 0.05 rispetto alle cellule coltivate in solo terreno (RPMI)

4.3. SAGGI DI ATTIVITA' DI "RADICAL SCAVENGING" DEI PE-EVOOs

Abbiamo valutato l'attività antiossidante di diverse concentrazioni di PE-EVOOs (0,5-50 $\mu\text{g/mL}$) eseguendo un saggio di scavenging del radicale DPPH, come descritto nei materiali e metodi, utilizzando dosi crescenti dei nostri estratti (0,5-50 $\mu\text{g/mL}$). I nostri dati hanno dimostrato che i PE-EVOOs possiedono un'elevata attività di scavenging radicalico dose-dipendente (Figura 9). In particolare, la concentrazione più bassa testata, pari a 0,5 $\mu\text{g/mL}$, ha determinato un'inibizione del DPPH di circa il 15%, raggiungendo il 90% di attività alla concentrazione di 50 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 9), dose alla quale è stata osservata solo una vitalità del 67% delle PBMCs dopo 48 ore di trattamento (Figura 8). Sulla base di questi dati, la concentrazione di PE-EVOOs scelta per i successivi

esperimenti in vitro è stata di 10 µg/mL, con un'attività di scavenging radicalico del 55% (IC50) e un effetto citotossico molto basso (circa 10%).

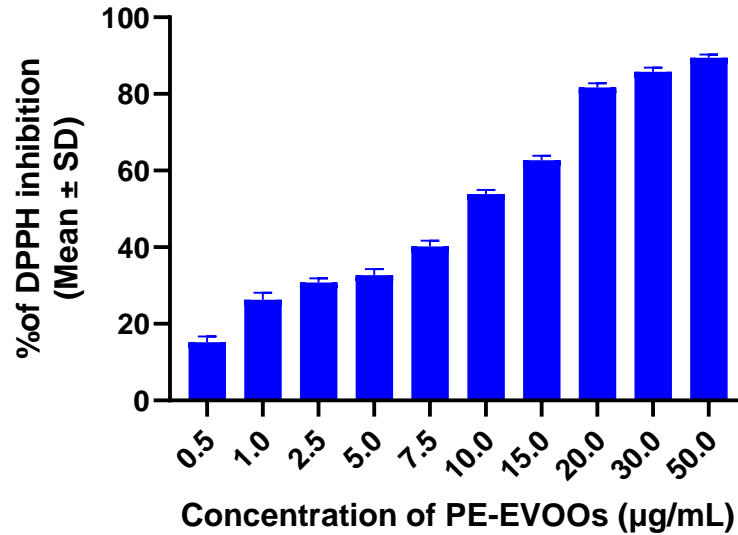


Figura 9. *I PE-EVOO possiedono attività di scavenging radicalico. L'attività antiossidante dei PE-EVOOs siciliani è stata valutata tramite il saggio di scavenging del radicale DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazile). Diverse concentrazioni di PE-EVOO (da 1 a 50 µg/mL) sono state aggiunte a una soluzione di DPPH in etanolo, e l'assorbanza di ciascuna concentrazione è stata misurata a 517 nm mediante spettrofotometro. I valori riportati rappresentano la media ± SD di tre esperimenti indipendenti; *** p-value summary < 0.001 rispetto al veicolo (etanolo).*

4.4. ANALISI CITOFUORIMETRICA DEGLI EFFETTI ANTI-INFIAMMATORI IN VITRO DEI PE-EVOOs SULLE PBMCs DI PAZIENTI CON AR E SULLE PBMCs DI SOGGETTI SANI STIMOLATE CON LPS

Per indagare l'effetto anti-infiammatorio dei PE-EVOOs, abbiamo trattato *in vitro* per 48 ore le PBMCs di 15 pazienti con AR e di 15 HS con 10 µg/ml di PE-EVOO. Le PBMCs dei soggetti sani sono state stimolate con LPS, 5 ug/mL per 24 ore, allo scopo di simulare *in vitro* le condizioni infiammatorie che caratterizzano i pazienti con AR. Non è

stata eseguita la stimolazione con LPS nelle PBMCs di pazienti con AR poiché è ampiamente documentato che l'elevata secrezione basale di citochine pro-infiammatorie che caratterizza tali pazienti determina una riduzione della capacità di produrre quantità aumentate di citochine in risposta a stimoli pro-infiammatori. Questo fenomeno sembra condurre a una risposta immunitaria compromessa, potenzialmente implicata nella patogenesi dell'infiammazione cronica che caratterizza l'AR e altre malattie reumatiche infiammatorie (IRDs) (84).

Dopo 48 ore di trattamento con 10 $\mu\text{g/ml}$ di PE-EVOOs, abbiamo eseguito un'analisi citofluorimetrica per valutare la percentuale delle PBMCs di 15 pazienti con AR (Figura 10 A) e di 15 HS (Figura 10 B), stimulate con LPS, che producono citochine infiammatorie, come TNF- α e IL-1 β , coinvolte nello sviluppo e nella progressione delle IRDs. Tale analisi ha messo in luce che il trattamento con PE-EVOOs induce una riduzione della percentuale delle PBMCs di pazienti con AR che producono entrambe le citochine rispetto a quelle non trattate: dal 4.73% (media \pm SD 0.681) al 3.40% (media \pm SD 0.490) per le PBMCs TNF- α^+ e dal 3.31% (media \pm SD 0.375) al 2.75 (media \pm SD 0.558) per le PBMCs IL-1 β^+ . Negli HS, la percentuale delle PBMCs stimulate con LPS e produttrici di entrambe le citochine è risultata diminuita dopo il trattamento con PE-EVOOs dal 2.49% (media \pm SD 0.347) allo 0.73% (media \pm SD 0.129) per il TNF- α e dal 3.35% (media \pm SD 0.334) all' 1.11% (media \pm SD 0.174) per l'IL-1 β , raggiungendo valori prossimi a quelli osservati nelle PBMCs non trattate (Figura 10 B). La figura 10 C e D proviene da un paziente con AR rappresentativo.

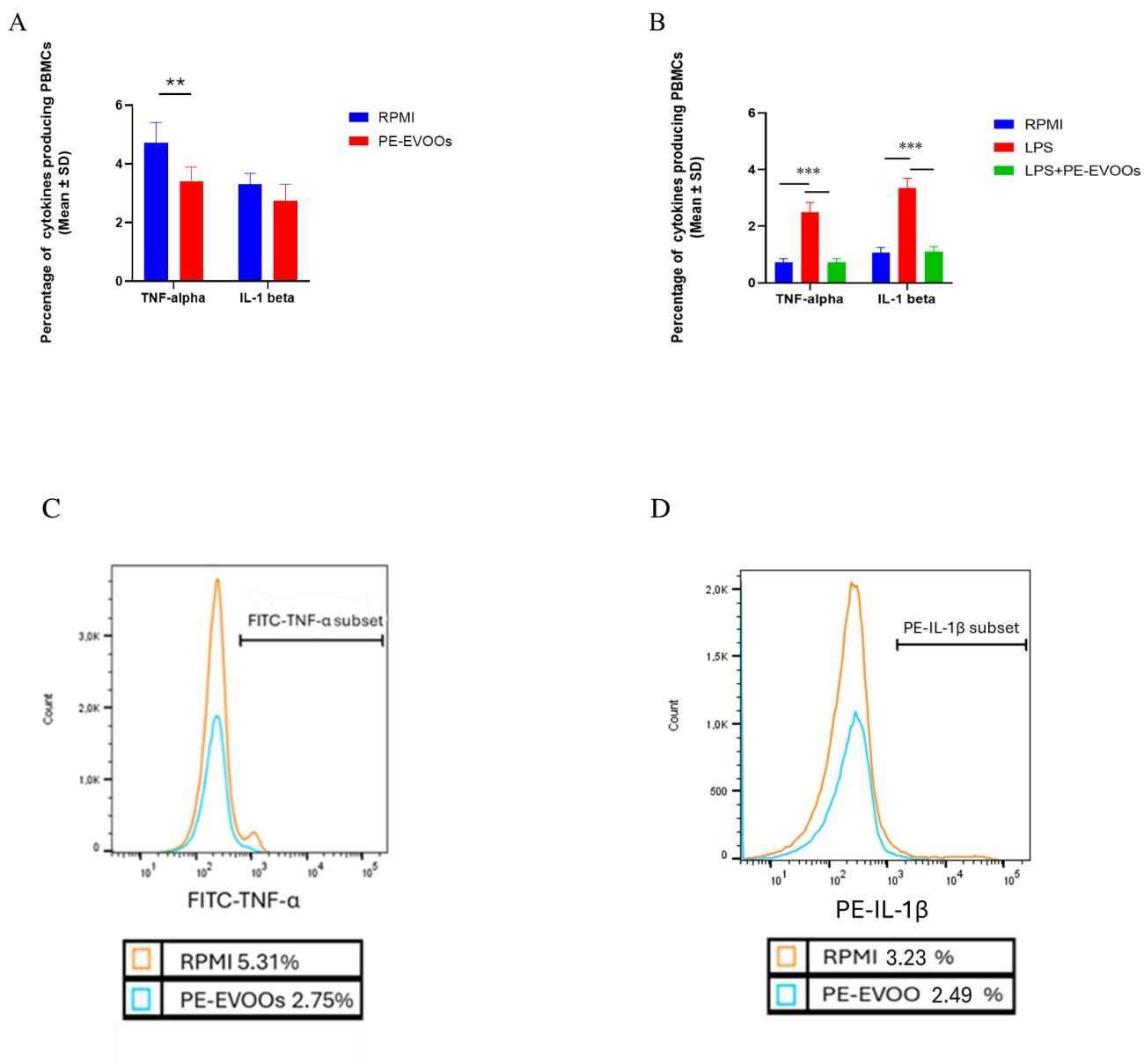


Figura 10. I PE-EVOO riducono la produzione di citochine antinfiammatorie nelle PBMCs stimulate con LPS di pazienti con AR e di soggetti sani. I dati cumulativi ottenuti dall'analisi citofluorimetrica effettuata su 15 pazienti con AR (A) e 15 HS (B), mostrano la percentuale delle PBMCs positive al TNF- α (linea blu) e all' IL-1 β (linea arancione). La produzione di entrambe le citochine si riduce dopo il trattamento con PE-EVOOs. Il confronto tra gli istogrammi della produzione di TNF- α (C) e IL-1 β (D) è ottenuto da un paziente rappresentativo con AR: ** $p < 0.01$ e * $p < 0.001$ rispetto alle cellule coltivate solo in terreno RPMI o con LPS.**

Inoltre, abbiamo analizzato l'effetto del trattamento con i nostri estratti sulla produzione di TNF- α da parte delle cellule T helper e dei monociti, al fine di comprendere quale subset fosse più suscettibile all'attività dei PE-EVOOs. Abbiamo riscontrato che 48 ore di trattamento con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ di PE-EVOOs determinano una riduzione della percentuale di monociti ($\text{CD}3^+/\text{CD}14^+$) TNF- α^+ nei pazienti con AR da 2.91 (media \pm SD 0.130) a 2.18 (media \pm SD 0.356) e negli HS da 0.79 (media \pm SD 0.065) nelle PBMCs stimolate con LPS a 0.54 (media \pm SD 0.097) nelle PBMCs stimolate con LPS e pre-trattate con PE-EVOOs. (Figura 11). La produzione di TNF- α dalle cellule T helper ($\text{CD}3^+/\text{CD}4^+$), invece è rimasta invariata.

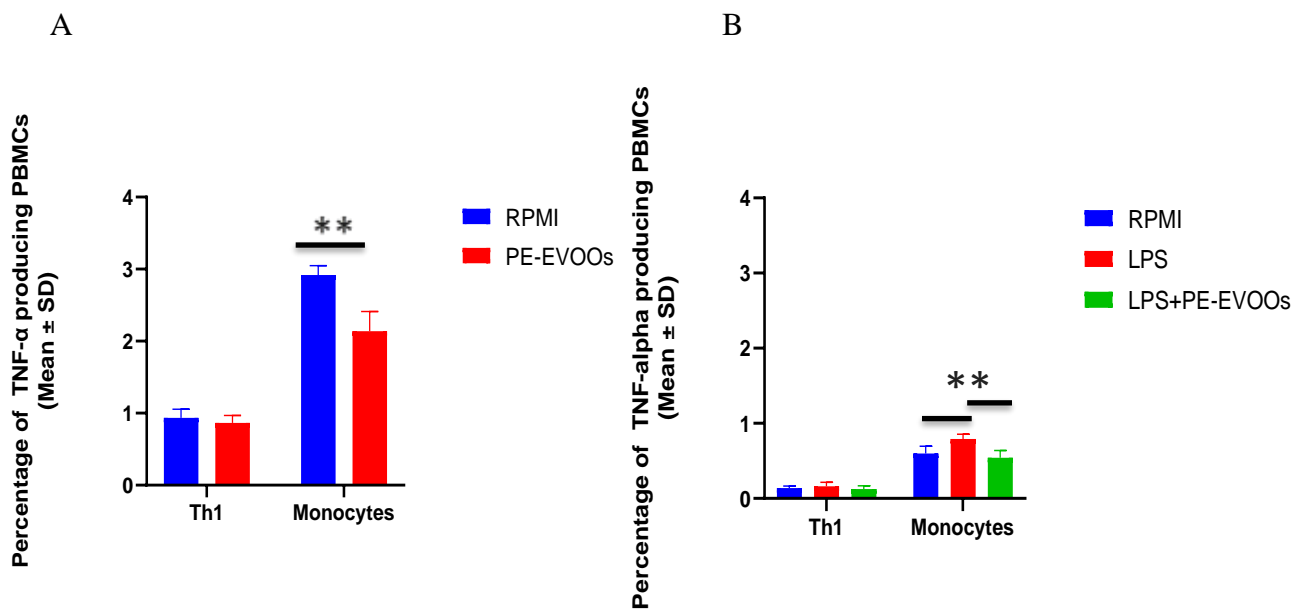
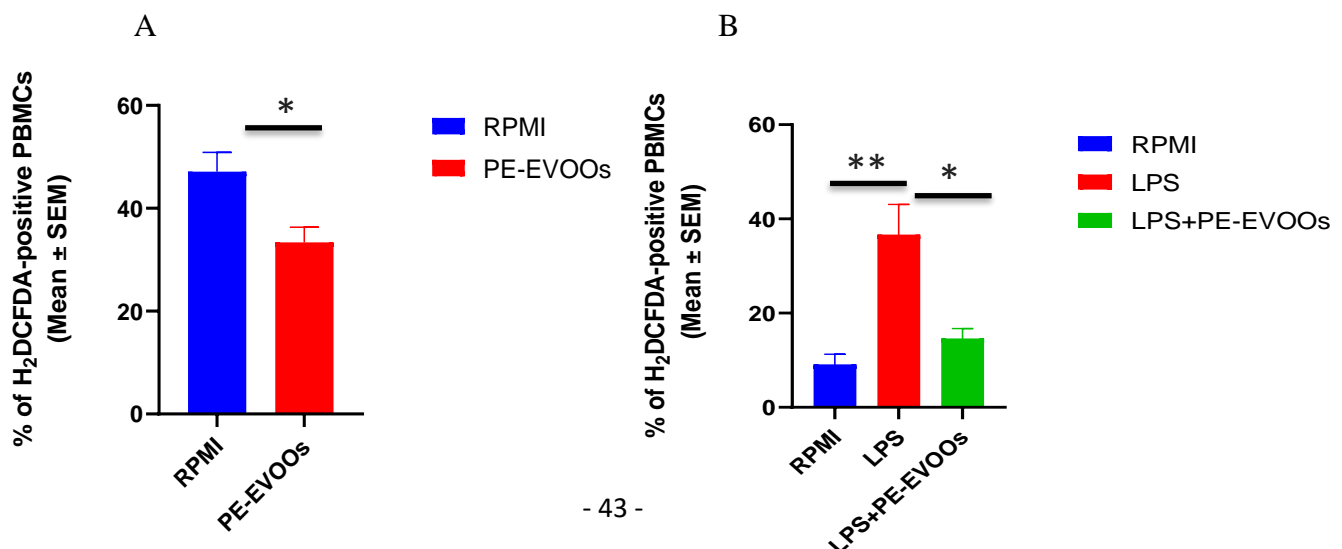


Figura 11. I PE-EVOO riducono la produzione di TNF- α solo dai monociti e non dalle cellule T helper. I dati cumulativi ottenuti dall'analisi citometrica a flusso di 15 pazienti con AR (A) e 15 HS (B) mostrano che solo i monociti positivi al TNF- α sono diminuiti dopo 48 ore di trattamento con PE-EVOOs. I T helper non subiscono variazioni. ** $p < 0.01$ rispetto alle cellule coltivate solo in terreno RPMI o con LPS.

4.5. IL TRATTAMENTO CON I PE-EVOOs RIDUCE LA PRODUZIONE DEI ROS NELLE PBMCs DEI PAZIENTI CON AR E NELLE PBMCs DI SOGGETTI SANI STIMOLATE CON LPS

È stato riportato che la produzione di ROS gioca un ruolo chiave nella patogenesi di diverse IRDs, come l'AR (85). Per questo motivo, abbiamo indagato se i PE-EVOOs fossero in grado di inibire la produzione di ROS o ridurre il contenuto nei PBMCs di pazienti con AR. L'analisi citofluorimetrica ottenuta utilizzando la sonda fluorescente H₂DCFDA in qualità di indicatore di ROS, ha mostrato come il trattamento di 48 ore con 10 µg/mL di PE-EVOOs, dose e tempo precedentemente valutati come efficaci, ma non tossici, determini una riduzione dei ROS intracellulari nelle PBMCs dei pazienti con AR rispetto alle PBMCs non trattate. In particolare, la percentuale media delle PBMCs H₂DCFDA⁺ è scesa da 47.14 (SD ± 8.322) a 33.40 (DS ± 6.542) quando trattate con PE-EVOOs, in pazienti con AR (Figura 12 A). Questo effetto è stato osservato anche nelle PBMCs degli HS, dove il trattamento è stato in grado di ridurre significativamente la produzione di ROS indotta dal trattamento con LPS (5 µg/ml), da una percentuale media di PBMCs H₂DCFDA⁺ pari a 36.68 (SD ± 14.268) a 14.60 (SD ± 4.771) quando pre-trattate con PE-EVOOs (Figura 12 B). La figura 12 C e D proviene da un paziente con AR e un HS rappresentativo, rispettivamente.



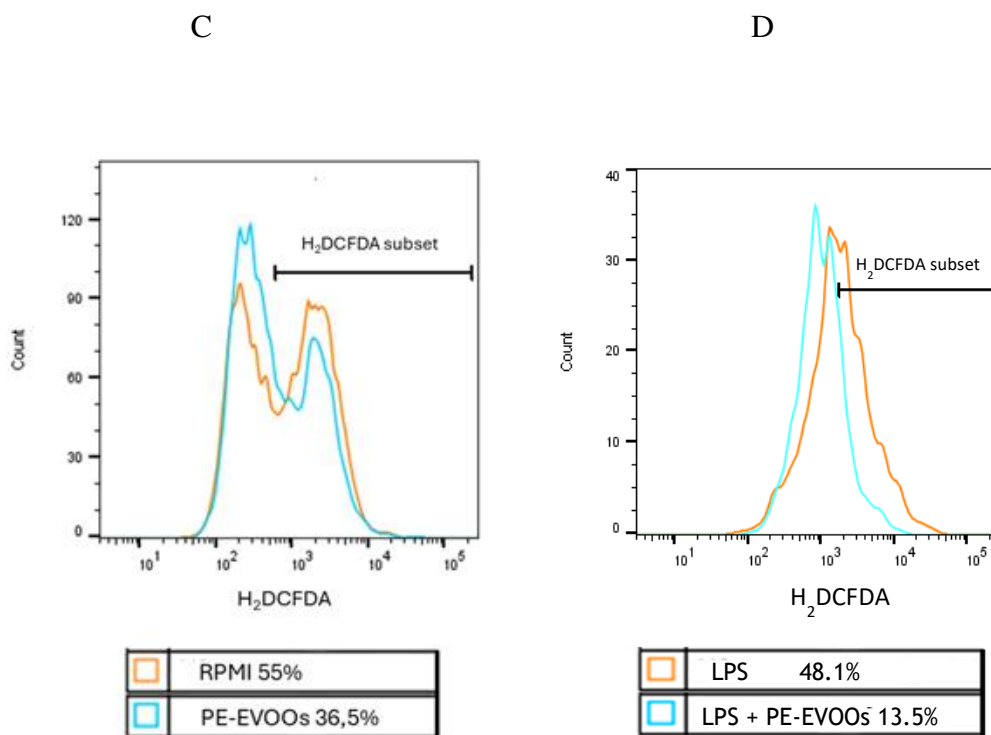


Figura 12. I PE-EVOO esercitano effetti antiossidanti sulle PBMCs di pazienti con AR (A) e sulle PBMCs di HS stimulate con LPS (B). Dati cumulativi ottenuti dall'analisi citofluorimetrica di 15 pazienti con AR (A) e 15 HS (B) sulle PBMCs stimulate con LPS e marcate per i ROS intracellulari utilizzando la sonda fluorescente H₂-DCFDA, come riportato nei Metodi. Sovrapposizione degli istogrammi della produzione di ROS intracellulari ottenuti dalle PBMCs di un paziente rappresentativo con AR (C) e di un HS (D). **p* < 0.05, ***p* < 0.01 rispetto alle cellule coltivate in terreno RPMI o con LPS.

4.6. IL TRATTAMENTO CON I PE-EVOOs AUMENTA I LIVELLI DI ESPRESSIONE DI NRF-2 E DEI SUOI TARGET TRASCRIZIONALI CATALASI E MnSOD NELLE PBMCs DI PAZIENTI CON AR E HS STIMOLATE CON LPS

Dopo aver confermato che i PE-EVOOs sono in grado di ridurre il contenuto di ROS nelle PBMCs di pazienti con AR e HS stimolati con LPS, abbiamo condotto esperimenti di western blot per investigare a fondo i meccanismi molecolari responsabili del loro effetto antiossidante. A tal fine, le analisi si sono concentrate sul fattore di trascrizione nucleare eritroide-2 (Nrf2), un regolatore emergente della resistenza cellulare agli ossidanti. Nrf2 è un fattore di trascrizione che controlla l'espressione basale e indotta di una serie di geni dipendenti dall'elemento di risposta antiossidante per regolare gli esiti fisiologici e patologici dell'esposizione agli ossidanti. I nostri dati mostrano che i livelli di espressione della forma fosforilata attiva di Nrf2 aumentano nelle PBMCs di pazienti con AR e HS stimolate con LPS quando trattati per 48 ore con 10 µg/ml di PE-EVOO, mentre i livelli di Nrf2 totale non cambiano (Figura 13). In accordo con questi dati, abbiamo anche dimostrato, tramite analisi western blot, che i livelli di espressione della Catalasi e della Manganese Superossido Dismutasi (MnSOD), due importanti enzimi scavenger dei ROS regolati trascrizionalmente da Nrf2 (86), sono aumentati in modo marcato nelle PBMCs di pazienti con AR e HS stimolati con LPS quando trattate con PE-EVOOs.

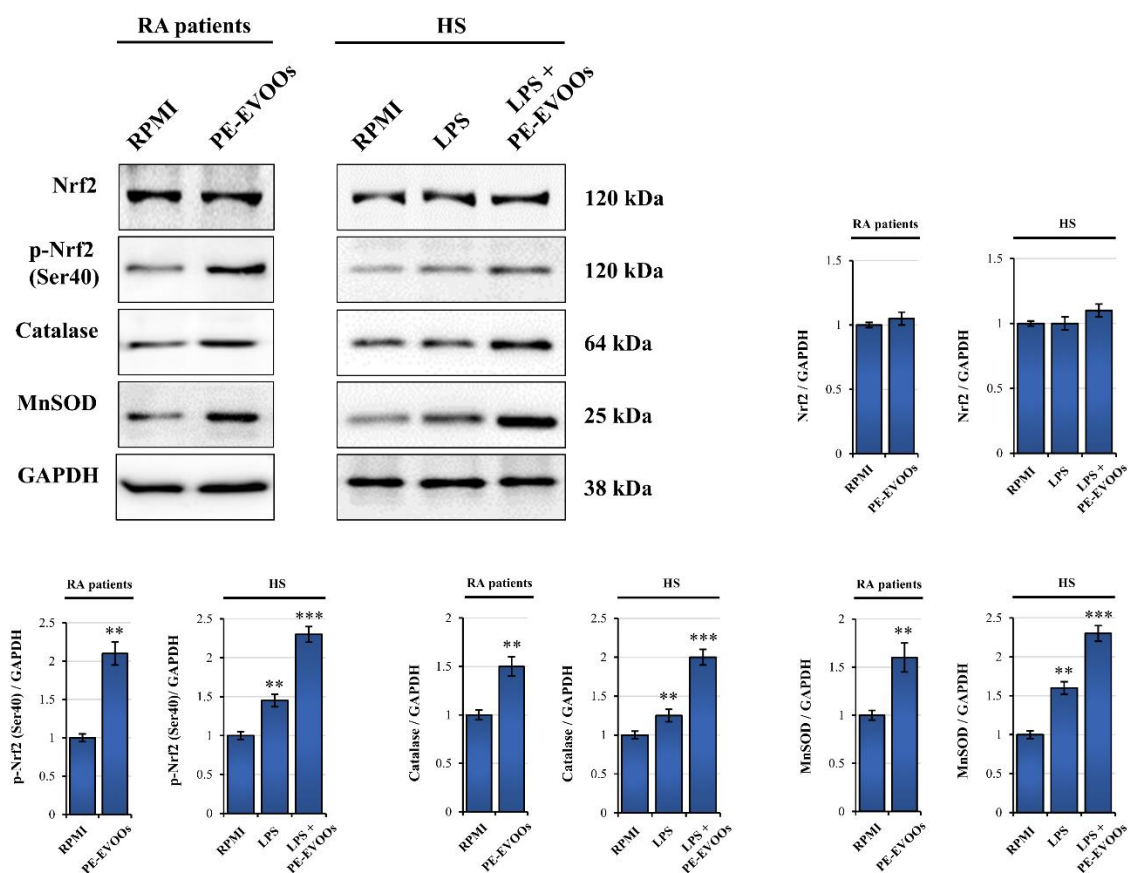


Figura 13. I PE-EVOO esercitano effetti antiossidanti upregolando la forma attiva di Nrf2 e i suoi target trascrizionali catalasi e MnSOD. Analisi Western Blotting di NRF2, p-NRF2, Catalasi e MnSOD nelle PBMCs di HS stimolati con LPS e in pazienti con AR trattati per 48 ore con 10 µg/mL di PE-EVOOs. Il caricamento uniforme delle proteine è stato verificato tramite immunoblotting per GAPDH. I grafici a barre rappresentano la media di tre esperimenti indipendenti ± DS. ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ rispetto alle cellule coltivate solo in terreno RPMI.

Complessivamente, questi risultati sembrano indicare che l'attivazione di Nrf2 svolga un ruolo nel comportamento antiossidante dei PE-EVOOs, portando ad un aumento dell'attività antiossidante cellulare.

4.7. IL TRATTAMENTO CON I PE-EVOOs RIDUCE L'ATTIVAZIONE DI NF- κ B NELLE PBMCs DI PAZIENTI CON AR E HS STIMOLATE CON LPS

Al giorno d'oggi, è noto che un'aumentata produzione di ROS amplifica la risposta infiammatoria up-regolando i geni associati alle citochine pro-infiammatorie attraverso l'attivazione del fattore NF- κ B, un fattore di trascrizione nucleare sensibile allo stato redox (87). NF- κ B è identificato come una delle principali vie infiammatorie responsabili dell'induzione dell'espressione dei geni bersaglio per citochine infiammatorie come IL-1 β , TNF- α e COX2, associate all'erosione ossea, all'ipersensibilità al dolore e alla progressione della malattia (88). Per questo motivo abbiamo anche analizzato, tramite western blotting, gli effetti di 48 ore di trattamento con 10 μ g/mL di PE-EVOO siciliani sui livelli di espressione di questo fattore di trascrizione e, come previsto, abbiamo riscontrato una riduzione della sua forma attiva e fosforilata nelle PBMCs sia dei pazienti con AR sia nelle PBMCs di soggetti sani stimolate con LPS (Figura 14). Il pretrattamento con i PE-EVOOs, inoltre, riduce i livelli di espressione di COX2, la cui espressione è up-regolata dall'aumentata secrezione di IL-1 β nelle PBMCs di pazienti con AR e HS stimolate con LPS (Figura 14).

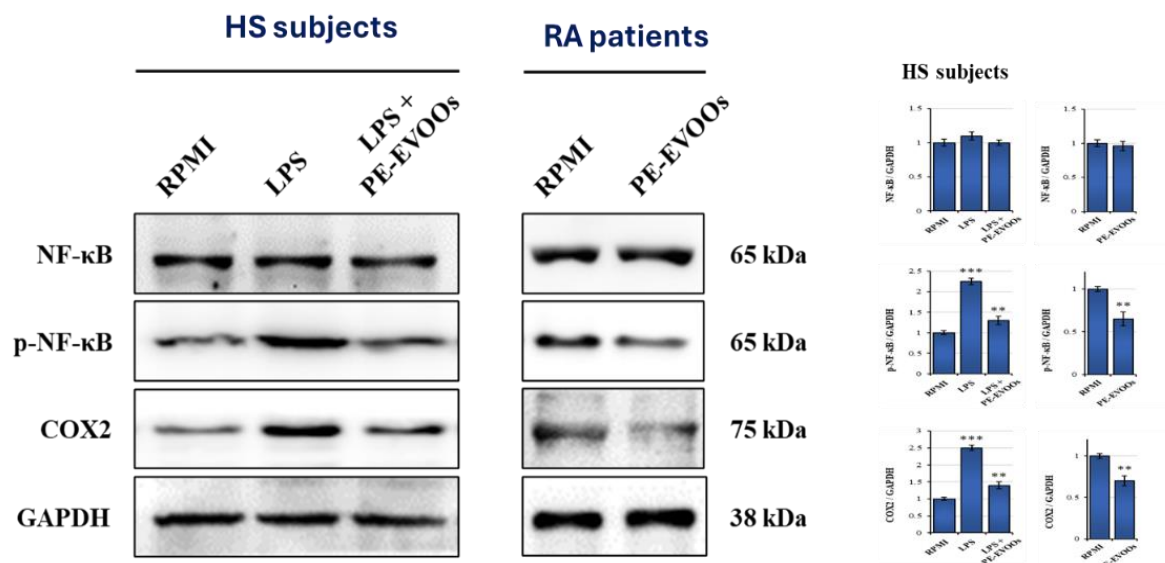


Figura 14. I PE-EVOO esercitano effetti antinfiammatori riducendo l'espressione della forma attiva di NF-κB e di COX2. Analisi Western Blotting di NF-κB, p- NF-κB e COX2 nei PBMCs di soggetti sani stimolati con LPS e nei pazienti con AR trattati per 48 ore con 10 μg/mL di PE-EVOOs. Il caricamento uniforme delle proteine è stato verificato mediante immunoblotting per GAPDH. I grafici a barre rappresentano la media di tre esperimenti indipendenti ± SD. ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$.

Infine, possiamo concludere che i PE-EVOOs possiedono forti proprietà antinfiammatorie e antiossidanti, in grado di modulare positivamente la risposta delle PBMCs di pazienti con AR in termini di generazione di citochine pro-infiammatorie e ROS.

5. DISCUSSIONE

Il nostro studio ha valutato l'attività antinfiammatoria e antiossidante dei PE-EVOOs nell'ambito della ricerca di nuovi agenti antinfiammatori e antiossidanti di origine naturale. Abbiamo dimostrato come i polifenoli estratti da EVOO siciliano riducano l'attivazione di NF- κ B e portino ad una riduzione dell'espressione di COX-2. Inoltre i PE-EVOOs hanno mostrato attività di "scavenging" dei radicali liberi, regolando positivamente l'espressione della Catalasi e di MnSOD, importanti enzimi scavenger dei ROS regolati trascrizionalmente da Nrf2, la cui forma fosforilata aumenta in seguito al trattamento con i PE-EVOOs. Pertanto, questo suggerisce come i PE-EVOOs possano essere considerati dei veri e propri farmaci naturali antinfiammatori, riducendo l'infiammazione *in toto*. Le citochine pro-infiammatorie sono elementi chiave nel processo infiammatorio e facilitano la comunicazione tra le cellule. Il TNF- α svolge una funzione centrale nella rete delle citochine infiammatorie, promuovendo il rilascio di IL-1 e IL-6 (89). Mentre i livelli fisiologici di queste citochine hanno un effetto protettivo sull'organismo, una loro produzione eccessiva è determinante nella patogenesi di malattie infiammatorie (90). Per questo motivo, ridurre la sintesi di citochine infiammatorie può rappresentare un metodo efficace per gestire l'infiammazione in numerose patologie (91).

L'aumento della produzione basale di TNF- α può essere associato al suo coinvolgimento attivo nella patogenesi di tutte le IRDs studiate. È noto che il TNF- α è una delle principali citochine implicate nello sviluppo della sindrome da attivazione dei macrofagi, una delle complicanze più gravi delle IRD, più comune nei pazienti con Lupus eritematoso sistemico (LES) (84). In particolare, un alto livello di TNF- α porta all'attivazione dei fibroblasti nei pazienti affetti da AR, con conseguente reclutamento di

cellule infiammatorie nella lesione e secrezione di citochine, catepsine, metalloproteinasi della matrice e altri mediatori infiammatori, che provocano cambiamenti distruttivi nelle articolazioni (92). Nella maggior parte delle IRDs, il livello di citochine pro-infiammatorie nel siero dei pazienti, incluso il TNF- α , correla con l'attività della malattia e l'efficacia della terapia (93-95).

L'IL-1 β è un membro della famiglia delle interleuchine 1, prodotta dai macrofagi attivati, dai monociti e da una sottopopolazione di cellule dendritiche chiamate slanDC, come proproteina, che viene processata proteoliticamente nella sua forma attiva da caspasi 1 (CASP1/ICE) (96). Questa citochina è un importante mediatore della risposta infiammatoria ed è coinvolta in varie attività cellulari, tra cui proliferazione, differenziazione e apoptosi cellulare. L'induzione della cicloossigenasi-2 (PTGS2/COX2) da parte di questa citochina nel sistema nervoso centrale (SNC) contribuisce all'ipersensibilità al dolore infiammatorio. I nostri dati mostrano che i PE-EVOO riducono i livelli di fattori pro-infiammatori, come le citochine TNF- α e IL-1 β , suggerendo che i PE-EVOO possano esercitare effetti antinfiammatori sulle PBMCs di pazienti affetti da AR naive o PBMCs di HS attivate con LPS.

La sintesi delle citochine infiammatorie è strettamente correlata all'incremento dell'attivazione dei principali regolatori trascrizionali, MAPK e NF- κ B. Le MAPK comprendono quattro sottofamiglie principali: ERK, JNK, p38 ed ERK5. Questi percorsi di segnalazione, noti anche come "chinasi attivate dallo stress", sono cruciali per il controllo dell'infiammazione (97, 98). Successivamente, tali vie attivano i fattori trascrizionali NF- κ B, i quali modulano l'espressione di diversi geni coinvolti in risposte cellulari funzionali. NF- κ B rimane inattivo nel citoplasma grazie al legame con I κ B.

Quando I κ B viene fosforilato, NF- κ B viene liberato e trasloca nel nucleo, dove regola la trascrizione di mediatori infiammatori come iNOS e COX-2 (87).

Nei mammiferi, la famiglia “NF- κ B” è costituita da 5 membri: RelA (p65), RelB, c-Rel, NF- κ B1 (p50 e il suo precursore p105), e NF- κ B2 (p52 e il suo precursore p100).

Queste subunità formano differenti omodimeri ed eterodimeri e ciascuno di essi attiva differenti geni target. Sebbene la forma attivata più frequente sia l’eterodimero RelA (p65) e p50, dimeri differenti possono legare differenti promotori NF- κ B-dipendenti, regolando la trascrizione di geni diversi, in base al tipo cellulare e allo stimolo.

Come riportato in letteratura, è noto che anche la fosforilazione sito-specifica delle subunità di NF- κ B può regolare positivamente o negativamente la trascrizione dei geni target, piuttosto che agire da semplice interruttore di accensione e spegnimento, con un impatto rilevante sulla funzione, stabilità, degradazione e attività trascrizionale dei dimeri di NF- κ B. Poiché la fosforilazione della Ser536 della subunità p65 inibisce la segnalazione di NF- κ B, contribuendo a prevenire infiammazioni pericolose, abbiamo valutato la capacità dei PE-EVOOs di modularne l’espressione nelle PBMCs di pazienti con AR e HS, dopo averle stimulate con LPS.

Pradere e colleghi, attraverso esperimenti con topi knock-in (topi S534A) che esprimono una versione mutata della p65 analoga alla Ser536 umana, hanno osservato un aumento dell’espressione dei geni dipendenti da NF- κ B nei topi dopo iniezione di LPS, riscontrando anche una maggiore mortalità rispetto ai topi selvatici (99). L’aumento della segnalazione di NF- κ B è in parte spiegato dall’aumentata stabilità della proteina p65 in seguito alla fosforilazione della Ser536. I nostri dati hanno dimostrato che il trattamento con PE-EVOOs induce una riduzione della NF- κ B p65 fosforilata nei pazienti con AR e

nelle PBMC di HS stimulate con LPS, mentre i livelli di espressione della NF- κ B totale non cambiano. Il trattamento con PE-EVOOs riduce inoltre i livelli di espressione di COX2, la cui espressione è aumentata a causa della maggiore secrezione di IL-1 β , nei pazienti con AR e nelle PBMC di HS stimulate con LPS (Figura 14). Pertanto, la down-regulation della fosfo-NF- κ B p65 (Ser536) potrebbe essere, in parte, responsabile dell'effetto anti-infiammatorio dei PE-EVOOs, essendo questa fosforilazione sito-specifica coinvolta nella sua maggiore stabilità.

I nostri dati inoltre sembrano confermare che i PE-EVOOs sono in grado di influenzare negativamente la via delle MAPK, dal momento che riducono l'espressione di citochine dipendenti da NF- κ B, e COX-2, riducendo così l'infiammazione.

E' stato osservato un legame tra infiammazione cronica e stress ossidativo, con i radicali liberi come causa di molte patologie croniche (100). Le cellule dispongono di sofisticati sistemi di difesa contro lo stress ossidativo, tra cui spiccano gli enzimi antiossidanti, la cui espressione è regolata a livello trascrizionale dal fattore Nrf2. Questo fattore promuove la trascrizione di enzimi di detossificazione di fase II, come NADPH, NAD(P)H chinone ossidoreduttasi 1, glutatione perossidasi, ferritina, ed eme ossigenasi-1 (HO-1). Tali geni antiossidanti esercitano una protezione contro vari danni cellulari e mediano effetti anti-infiammatori, contribuendo a modulare il decorso della malattia (101-103).

Nrf2 previene inoltre l'up-regolazione trascrizionale indotta dall'LPS di parecchie citochine pro-infiammatorie, quali IL-6 and IL-1 β (104-106) la cui produzione risulta infatti aumentata in topi Nrf2 $^{-/-}$ con colite indotta dal destrano-solfato, inibisce la produzione a valle di IL-17 e altre citochine Th1, riducendo la progressione della malattia

in un modello sperimentale di sclerosi multipla, l'encefalite autoimmune (107). Inoltre, I geni anti-ossidanti dipendenti da Nrf2, quali HO-1, NQO-1, Gclc, e Gclm bloccano la produzione di TNF- α , IL-6, monocyte chemo attractant protein-1 (MCP1), macrophage inflammatory protein-2 (MIP2) e altri mediatori dell'inflammatione.

Nel nostro modello sperimentale, una volta attivata dal trattamento con i PE-EVOOs, Nrf2 attiva a sua volta la trascrizione di importanti enzimi antiossidanti, come MnSOD e catalasi nelle PBMCs di pazienti con AR Naive e nelle PBMCs di HS stimulate con LPS, evidenziandone così il contributo alla riduzione dello stress ossidativo.

I nostri risultati sottolineano quindi come la marcata attività antinfiammatoria dei PE-EVOOs sia fortemente correlata alla riduzione dello stress ossidativo attraverso l'aumentata espressione della forma attiva di Nrf2.

6. CONCLUSIONI

I risultati dello studio confermano l'efficacia antinfiammatoria e antiossidante dei PE-EVOOs e ne evidenziano il potenziale come agenti terapeutici naturali. L'azione antinfiammatoria dei PE-EVOOs si esprime attraverso la soppressione della via di segnalazione MAPK e la conseguente riduzione dell'attivazione di NF- κ B, che porta a una diminuzione dell'espressione di COX-2, un enzima chiave nell'infiammazione.

Inoltre, i PE-EVOOs inibiscono la sintesi di importanti citochine pro-infiammatorie come TNF- α e IL-1 β , riducendo così l'infiammazione nelle patologie croniche e degenerative. Parallelamente, i PE-EVOOs hanno mostrato un significativo effetto antiossidante, neutralizzando i ROS e stimolando la produzione di enzimi scavenger come la Catalasi e MnSOD, regolati dal fattore trascrizionale Nrf2. Questo suggerisce un effetto di protezione cellulare dallo stress ossidativo, spesso associato all'infiammazione cronica. Questi risultati supportano quindi l'idea che i PE-EVOOs possano svolgere un ruolo fondamentale sia nella modulazione delle risposte infiammatorie che nella protezione antiossidante, proponendosi come potenziali opzioni terapeutiche naturali per il trattamento delle malattie infiammatorie croniche come l'AR. Infatti, grazie alle loro proprietà antinfiammatorie e antiossidanti, possono rappresentare un utile complemento alle terapie convenzionali nell'AR, aiutando a ridurre il dolore e l'infiammazione in modo naturale e potenziando gli effetti dei trattamenti attuali.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Smolen J, Aletaha D, Barton A, Burmester G, Emery P, Firestein G, et al. Rheumatoid arthritis. *Nature reviews. Dis Primers* 418001. 2018.
2. Lin Y-J, Anzaghe M, Schülke S. Update on the pathomechanism, diagnosis, and treatment options for rheumatoid arthritis. *Cells*. 2020;9(4):880.
3. Eriksson JK, Neovius M, Ernestam S, Lindblad S, Simard JF, Askling J. Incidence of rheumatoid arthritis in Sweden: a nationwide population-based assessment of incidence, its determinants, and treatment penetration. *Arthritis care & research*. 2013;65(6):870-8.
4. Myasoedova E, Crowson CS, Kremers HM, Therneau TM, Gabriel SE. Is the incidence of rheumatoid arthritis rising?: results from Olmsted County, Minnesota, 1955–2007. *Arthritis & Rheumatism*. 2010;62(6):1576-82.
5. Zen M, Salmaso L, Amidei CB, Giollo A, Fedeli U, Bellio S, et al. AB1628 the incidence and prevalence of rheumatoid arthritis in Italy in the last decade. *BMJ Publishing Group Ltd*; 2023.
6. Jang S, Kwon E-J, Lee JJ. Rheumatoid arthritis: pathogenic roles of diverse immune cells. *International journal of molecular sciences*. 2022;23(2):905.
7. Arleevskaya M, Takha E, Petrov S, Kazarian G, Novikov A, Larionova R, et al. Causal risk and protective factors in rheumatoid arthritis: A genetic update. *Journal of Translational Autoimmunity*. 2021;4:100119.
8. Gioia C, Lucchino B, Tarsitano MG, Iannuccelli C, Di Franco M. Dietary habits and nutrition in rheumatoid arthritis: can diet influence disease development and clinical manifestations? *Nutrients*. 2020;12(5):1456.
9. Alamanos Y, Drosos AA. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmunity reviews*. 2005;4(3):130-6.
10. Marcelino G, Hiane PA, Freitas KdC, Santana LF, Pott A, Donadon JR, et al. Effects of olive oil and its minor components on cardiovascular diseases, inflammation, and gut microbiota. *Nutrients*. 2019;11(8):1826.
11. Matsumoto H, Fujita Y, Asano T, Matsuoka N, Temmoku J, Sato S, et al. Association between inflammatory cytokines and immune-checkpoint molecule in rheumatoid arthritis. *PloS one*. 2021;16(11):e0260254.
12. Chang K, Yang SM, Kim SH, Han KH, Park SJ, Shin JI. Smoking and rheumatoid arthritis. *International journal of molecular sciences*. 2014;15(12):22279-95.
13. Perricone C, Ceccarelli F, Matteo S, Di Carlo G, Bogdanos DP, Lucchetti R, et al. *Porphyromonas gingivalis* and rheumatoid arthritis. *Current opinion in rheumatology*. 2019;31(5):517-24.
14. McGraw WT, Potempa J, Farley D, Travis J. Purification, characterization, and sequence analysis of a potential virulence factor from *Porphyromonas gingivalis*, peptidylarginine deiminase. *Infection and immunity*. 1999;67(7):3248-56.
15. Yu MB, Langridge WH. The function of myeloid dendritic cells in rheumatoid arthritis. *Rheumatology international*. 2017;37:1043-51.
16. Kleinewietfeld M, Hafler DA, editors. The plasticity of human Treg and Th17 cells and its role in autoimmunity. *Seminars in immunology*; 2013: Elsevier.
17. Mellado M, Martínez-Muñoz L, Cascio G, Lucas P, Pablos JL, Rodríguez-Frade JM. T cell migration in rheumatoid arthritis. *Frontiers in immunology*. 2015;6:384.
18. Guggino G, Ferrante A, Macaluso F, Triolo G, Ciccia F. Pathogenesis of polymyalgia rheumatica. *Reumatismo*. 2018;70(1):10-7.
19. Schulze-Koops H, Kalden JR. The balance of Th1/Th2 cytokines in rheumatoid arthritis. *Best practice & research Clinical rheumatology*. 2001;15(5):677-91.

20. Luo P, Wang P, Xu J, Hou W, Xu P, Xu K, et al. Immunomodulatory role of T helper cells in rheumatoid arthritis: a comprehensive research review. *Bone & joint research*. 2022;11(7):426-38.
21. Toh M-L, Miossec P. The role of T cells in rheumatoid arthritis: new subsets and new targets. *Current opinion in rheumatology*. 2007;19(3):284-8.
22. Steinman L. A brief history of TH17, the first major revision in the TH1/TH2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nature medicine*. 2007;13(2):139-45.
23. Wu X, Tian J, Wang S. Insight into non-pathogenic Th17 cells in autoimmune diseases. *Frontiers in immunology*. 2018;9:1112.
24. Huber S, Gagliani N, Esplugues E, O'Connor W, Huber FJ, Chaudhry A, et al. Th17 cells express interleukin-10 receptor and are controlled by Foxp3- and Foxp3+ regulatory CD4+ T cells in an interleukin-10-dependent manner. *Immunity*. 2011;34(4):554-65.
25. Onishi RM, Gaffen SL. Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology*. 2010;129(3):311-21.
26. Schinocca C, Rizzo C, Fasano S, Grasso G, La Barbera L, Ciccia F, et al. Role of the IL-23/IL-17 pathway in rheumatic diseases: an overview. *Frontiers in immunology*. 2021;12:637829.
27. Ikeuchi H, Kuroiwa T, Hiramatsu N, Kaneko Y, Hiromura K, Ueki K, et al. Expression of interleukin-22 in rheumatoid arthritis: potential role as a proinflammatory cytokine. *Arthritis & Rheumatism*. 2005;52(4):1037-46.
28. Lotfi N, Thome R, Rezaei N, Zhang G-X, Rezaei A, Rostami A, et al. Roles of GM-CSF in the pathogenesis of autoimmune diseases: an update. *Frontiers in immunology*. 2019;10:1265.
29. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham III CO, et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis & rheumatism*. 2010;62(9):2569-81.
30. Aggarwal R, Liao K, Nair R, Ringold S, Costenbader KH. Anti-citrullinated peptide antibody (ACPA) assays and their role in the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2009;61(11):1472.
31. Harre U, Georgess D, Bang H, Bozec A, Axmann R, Ossipova E, et al. Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122(5):1791-802.
32. Coutant F. Pathogenic effects of anti-citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis—role for glycosylation. *Joint Bone Spine*. 2019;86(5):562-7.
33. Ingegnoli F, Castelli R, Gualtierotti R. Rheumatoid factors: clinical applications. *Disease markers*. 2013;35(6):727-34.
34. Sokolove J, Johnson DS, Lahey LJ, Wagner CA, Cheng D, Thiele GM, et al. Rheumatoid factor as a potentiator of anti-citrullinated protein antibody-mediated inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis & rheumatology*. 2014;66(4):813-21.
35. Conforti A, Di Cola I, Pavlych V, Ruscitti P, Berardicurti O, Ursini F, et al. Beyond the joints, the extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis. *Autoimmunity reviews*. 2021;20(2):102735.
36. Cojocaru M, Cojocaru IM, Silosi I, Vrabie CD, Tanasescu R. Extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis. *Maedica*. 2010;5(4):286.
37. England BR. Clinical manifestations of rheumatoid arthritis. Up to date www.uptodate.com. 2023.
38. Lehtinen J, Kaarela K, Belt E, Kautiainen H, Kauppi M, Lehto M. Incidence of acromioclavicular joint involvement in rheumatoid arthritis: a 15 year endpoint study. *The Journal of rheumatology*. 1999;26(6):1239-41.
39. Pinheiro FA, Souza DC, Sato EI. A study of multiple causes of death in rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*. 2015;42(12):2221-8.

40. Piecyk ML, Aminoff MJ. Neurologic manifestations of rheumatoid arthritis. uptodate; 2019.
41. Solomon DH, Goodson NJ, Katz JN, Weinblatt ME, Avorn J, Setoguchi S, et al. Patterns of cardiovascular risk in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2006;65(12):1608-12.
42. Kang EH, Ha Y-J, Lee YJ. Autoantibody biomarkers in rheumatic diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(4):1382.
43. Gavrilă B, Ciofu C, Stoica V. Biomarkers in rheumatoid arthritis, what is new? *Journal of medicine and life*. 2016;9(2):144.
44. Fragoulis GE, Nikiphorou E, Dey M, Zhao SS, Courvoisier DS, Arnaud L, et al. 2022 EULAR recommendations for screening and prophylaxis of chronic and opportunistic infections in adults with autoimmune inflammatory rheumatic diseases. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2023;82(6):742-53.
45. Cain DW, Cidlowski JA. Immune regulation by glucocorticoids. *Nature Reviews Immunology*. 2017;17(4):233-47.
46. Smolen JS, Landewé RB, Bergstra SA, Kerschbaumer A, Sepriano A, Aletaha D, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2022 update. *Annals of the rheumatic diseases*. 2023;82(1):3-18.
47. Ćwierkot J, Szechiński J. Methotrexate in rheumatoid arthritis. *Pharmacol rep*. 2006;58(10086):473-92.
48. Guggino G, Giardina A, Ferrante A, Giardina G, Schinocca C, Sireci G, et al. The in vitro addition of methotrexate and/or methylprednisolone determines peripheral reduction in Th17 and expansion of conventional Treg and of IL-10 producing Th17 lymphocytes in patients with early rheumatoid arthritis. *Rheumatology International*. 2015;35:171-5.
49. Ma X, Xu S. TNF inhibitor therapy for rheumatoid arthritis. *Biomedical reports*. 2013;1(2):177-84.
50. Guggino G, Giardina AR, Raimondo S, Giardina G, Sireci G, Dieli F, et al. Targeting IL-6 signalling in early rheumatoid arthritis is followed by Th1 and Th17 suppression and Th2 expansion. *Clin Exp Rheumatol*. 2014;32(1):77-81.
51. Js S. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(6):964-75.
52. Pescovitz MD. Rituximab, an anti-cd20 monoclonal antibody: history and mechanism of action. *American journal of transplantation*. 2006;6(5):859-66.
53. Edwards JC, Szczepański L, Szechiński J, Filipowicz-Sosnowska A, Emery P, Close DR, et al. Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *New England Journal of Medicine*. 2004;350(25):2572-81.
54. Emery P, Fleischmann R, Filipowicz-Sosnowska A, Schechtman J, Szczepanski L, Kavanaugh A, et al. The efficacy and safety of rituximab in patients with active rheumatoid arthritis despite methotrexate treatment: results of a phase IIB randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging trial. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*. 2006;54(5):1390-400.
55. Cohen SB, Emery P, Greenwald MW, Dougados M, Furie RA, Genovese MC, et al. Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks. *Arthritis & Rheumatism*. 2006;54(9):2793-806.
56. Bucciantini M, Leri M, Nardiello P, Casamenti F, Stefani M. Olive polyphenols: Antioxidant and anti-inflammatory properties. *Antioxidants*. 2021;10(7):1044.

57. Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2009;2(5):270-8.
58. Guasch-Ferré M, Willett W. The Mediterranean diet and health: A comprehensive overview. *Journal of internal medicine*. 2021;290(3):549-66.
59. Keys A. Coronary heart disease in seven countries. *Nutrition*. 1997;3(13):249+ 53.
60. Bach-Faig A, Berry EM, Lairon D, Reguant J, Trichopoulou A, Dernini S, et al. Mediterranean diet pyramid today. Science and cultural updates. *Public health nutrition*. 2011;14(12A):2274-84.
61. Tripoli E, Giammanco M, Tabacchi G, Di Majo D, Giammanco S, La Guardia M. The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutrition research reviews*. 2005;18(1):98-112.
62. Aparicio-Soto M, Sánchez-Hidalgo M, Rosillo MÁ, Castejón ML, Alarcón-de-la-Lastra C. Extra virgin olive oil: a key functional food for prevention of immune-inflammatory diseases. *Food & function*. 2016;7(11):4492-505.
63. Harman D. Free radical theory of aging. *Mutation Research/DNAging*. 1992;275(3-6):257-66.
64. Beauchamp GK, Keast RS, Morel D, Lin J, Pika J, Han Q, et al. Ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature*. 2005;437(7055):45-6.
65. Rudrapal M, Khairnar SJ, Khan J, Dukhyil AB, Ansari MA, Alomary MN, et al. Dietary polyphenols and their role in oxidative stress-induced human diseases: Insights into protective effects, antioxidant potentials and mechanism (s) of action. *Frontiers in pharmacology*. 2022;13:806470.
66. Grosso G, Godos J, Lamuela-Raventos R, Ray S, Micek A, Pajak A, et al. A comprehensive meta-analysis on dietary flavonoid and lignan intake and cancer risk: Level of evidence and limitations. *Molecular nutrition & food research*. 2017;61(4):1600930.
67. Pratelli G, Tamburini B, Carlisi D, De Blasio A, D'Anneo A, Emanuele S, et al. Foodomics-Based Approaches Shed Light on the Potential Protective Effects of Polyphenols in Inflammatory Bowel Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(19):14619.
68. Jimenez-Lopez C, Carpena M, Lourenço-Lopes C, Gallardo-Gomez M, Lorenzo JM, Barba FJ, et al. Bioactive compounds and quality of extra virgin olive oil. *Foods*. 2020;9(8):1014.
69. Silenzi A, Giovannini C, Scazzocchio B, Vari R, D'Archivio M, Santangelo C, et al. Extra virgin olive oil polyphenols: Biological properties and antioxidant activity. *Pathology: Elsevier*; 2020. p. 225-33.
70. Ruiz-Gutiérrez V, Muriana FJ, Guerrero A, Cert AM, Villar J. Plasma lipids, erythrocyte membrane lipids and blood pressure of hypertensive women after ingestion of dietary oleic acid from two different sources. *Journal of hypertension*. 1996;14(12):1483-90.
71. Owen R, Mier W, Giacosa A, Hull W, Spiegelhalder B, Bartsch H. Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food and Chemical Toxicology*. 2000;38(8):647-59.
72. Cerretani L, Motilva M-J, Romero M-P, Bendini A, Lercker G. Pigment profile and chromatic parameters of monovarietal virgin olive oils from different Italian cultivars. *European Food Research and Technology*. 2008;226:1251-8.
73. Chan Y-M, Demonty I, Pelled D, Jones PJ. Olive oil containing olive oil fatty acid esters of plant sterols and dietary diacylglycerol reduces low-density lipoprotein cholesterol and decreases the tendency for peroxidation in hypercholesterolaemic subjects. *British Journal of Nutrition*. 2007;98(3):563-70.
74. Gouvinhas I, Machado N, Sobreira C, Domínguez-Perles R, Gomes S, Rosa E, et al. Critical review on the significance of olive phytochemicals in plant physiology and human health. *Molecules*. 2017;22(11):1986.

75. Serra A, Rubió L, Borràs X, Macià A, Romero MP, Motilva MJ. Distribution of olive oil phenolic compounds in rat tissues after administration of a phenolic extract from olive cake. *Molecular nutrition & food research*. 2012;56(3):486-96.
76. Rosillo MÁ, Alcaraz MJ, Sánchez-Hidalgo M, Fernández-Bolaños JG, Alarcón-de-la-Lastra C, Ferrándiz ML. Anti-inflammatory and joint protective effects of extra-virgin olive-oil polyphenol extract in experimental arthritis. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2014;25(12):1275-81.
77. Rosignoli P, Fuccelli R, Fabiani R, Servili M, Morozzi G. Effect of olive oil phenols on the production of inflammatory mediators in freshly isolated human monocytes. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2013;24(8):1513-9.
78. Cicerale S, Lucas L, Keast R. Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil. *Current opinion in biotechnology*. 2012;23(2):129-35.
79. Aparicio-Soto M, Redhu D, Sánchez-Hidalgo M, Fernández-Bolaños JG, Alarcón-de-la-Lastra C, Worm M, et al. Olive-Oil-Derived Polyphenols Effectively Attenuate Inflammatory Responses of Human Keratinocytes by Interfering with the NF- κ B Pathway. *Molecular nutrition & food research*. 2019;63(21):1900019.
80. Scotece M, Conde J, Abella V, Lopez V, Pino J, Lago F, et al. New drugs from ancient natural foods. Oleocanthal, the natural occurring spicy compound of olive oil: a brief history. *Drug Discovery Today*. 2015;20(4):406-10.
81. Abramson SB. Nitric oxide in inflammation and pain associated with osteoarthritis. *Arthritis research & therapy*. 2008;10:1-7.
82. Raimondo S, Urzì O, Meraviglia S, Di Simone M, Corsale AM, Rabienezhad Ganji N, et al. Anti-inflammatory properties of lemon-derived extracellular vesicles are achieved through the inhibition of ERK/NF- κ B signalling pathways. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2022;26(15):4195-209.
83. Faddetta T, Polito G, Abbate L, Alibrandi P, Zerbo M, Caldiero C, et al. Bioactive metabolite survey of actinobacteria showing plant growth promoting traits to develop novel biofertilizers. *Metabolites*. 2023;13(3):374.
84. Bogatyreva A, Gerasimova E, Kirichenko T, Markina YV, Popkova T, Shalygina M, et al., editors. Proinflammatory Activation of Monocytes in Patients with Immunoinflammatory Rheumatic Diseases. *Doklady Biochemistry and Biophysics*; 2024: Springer.
85. Shufang M, Xiaojiao H, Yinhong K. Pro-inflammatory cytokine IL-21 correlates with the reactive oxygen species and 25-hydroxy vitamin D in rheumatoid arthritis patients. *Immunity, Inflammation and Disease*. 2024;12(7):e1308.
86. Cernigliaro C, D'Anneo A, Carlisi D, Giuliano M, Marino Gammazza A, Barone R, et al. Ethanol-mediated stress promotes autophagic survival and aggressiveness of colon cancer cells via activation of Nrf2/HO-1 pathway. *Cancers*. 2019;11(4):505.
87. Yang C-l, Wang S-b, He W-p, Liu J-j. Anti-oxidant and Anti-inflammatory Effects of Ethanol Extract from *Polygala sibirica* L. var *megalopha* Fr. on Lipopolysaccharide-Stimulated RAW264. 7 Cells. *Chinese Journal of Integrative Medicine*. 2023;29(10):905-13.
88. Roman-Blas J, Jimenez S. NF- κ B as a potential therapeutic target in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Osteoarthritis and cartilage*. 2006;14(9):839-48.
89. Bian M, Zhen D, Shen Q-K, Du H-H, Ma Q-Q, Quan Z-S. Structurally modified glycyrrhetic acid derivatives as anti-inflammatory agents. *Bioorganic Chemistry*. 2021;107:104598.
90. Splichal I, Rychlik I, Splichalova I, Karasova D, Splichalova A. Toll-Like Receptor 4 Signaling in the Ileum and Colon of Gnotobiotic Piglets Infected with *Salmonella Typhimurium* or Its Isogenic Δ rfa Mutants. *Toxins*. 2020;12(9):545.

91. Zhen D, Xuan T-q, Hu B, Bai X, Fu D-n, Wang Y, et al. Pteryxin attenuates LPS-induced inflammatory responses and inhibits NLRP3 inflammasome activation in RAW264. 7 cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 2022;284:114753.
92. Goldring SR. Pathogenesis of bone erosions in rheumatoid arthritis. *Current opinion in rheumatology*. 2002;14(4):406-10.
93. Lama M, Sarkar R, Ghosh B. Serum cytokine profiles in patients with rheumatoid arthritis before and after treatment with methotrexate. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 2023;43(8):344-50.
94. Лапкина Н, Баранов А, Абайтова Н, Левшин Н, Авдеева А, Леонтьева Е, et al. Динамика клинических проявлений и концентрации цитокинов у больных ревматоидным артритом на фоне терапии тофацитинибом. *Научно-практическая ревматология*. 2021;59(6):693-9.
95. Pehlivan Y, Onat AM, Ceylan N, Turkbeyler IH, Buyukhatipoglu H, Comez G, et al. Serum leptin, resistin and TNF- α levels in patients with systemic sclerosis: the role of adipokines in scleroderma. *International Journal of Rheumatic Diseases*. 2012;15(4):374-9.
96. Kwant LE, Vegting Y, Tsang-a-Sjoe MW, Kwakernaak AJ, Vogt L, Voskuyl AE, et al. Macrophages in lupus nephritis: exploring a potential new therapeutic avenue. *Autoimmunity Reviews*. 2022;21(12):103211.
97. Ha AT, Rahmawati L, You L, Hossain MA, Kim J-H, Cho JY. Anti-inflammatory, antioxidant, moisturizing, and antimelanogenesis effects of quercetin 3-O- β -D-glucuronide in human keratinocytes and melanoma cells via activation of NF- κ B and AP-1 pathways. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;23(1):433.
98. Ronkina N, Gaestel M. MAPK-activated protein kinases: servant or partner? *Annual review of biochemistry*. 2022;91(1):505-40.
99. Pradère J-P, Hernandez C, Koppe C, Friedman RA, Luedde T, Schwabe RF. Negative regulation of NF- κ B p65 activity by serine 536 phosphorylation. *Science signaling*. 2016;9(442):ra85-ra.
100. Peng J, Hu T, Li J, Du J, Zhu K, Cheng B, et al. Shepherd's Purse Polyphenols Exert Its Anti-Inflammatory and Antioxidative Effects Associated with Suppressing MAPK and NF- κ B Pathways and Heme Oxygenase-1 Activation. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2019;2019(1):7202695.
101. Braun S, Hanselmann C, Gassmann MG, auf dem Keller U, Born-Berclaz C, Chan K, et al. Nrf2 transcription factor, a novel target of keratinocyte growth factor action which regulates gene expression and inflammation in the healing skin wound. *Molecular and cellular biology*. 2002.
102. Arisawa T, Tahara T, Shibata T, Nagasaka M, Nakamura M, Kamiya Y, et al. The relationship between Helicobacter pylori infection and promoter polymorphism of the Nrf2 gene in chronic gastritis. *International journal of molecular medicine*. 2007;19(1):143-8.
103. Chen X-L, Dodd G, Thomas S, Zhang X, Wasserman MA, Rovin BH, et al. Activation of Nrf2/ARE pathway protects endothelial cells from oxidant injury and inhibits inflammatory gene expression. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2006;290(5):H1862-H70.
104. Kobayashi EH, Suzuki T, Funayama R, Nagashima T, Hayashi M, Sekine H, et al. Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. *Nature communications*. 2016;7(1):1-14.
105. Khor TO, Huang M-T, Kwon KH, Chan JY, Reddy BS, Kong A-N. Nrf2-deficient mice have an increased susceptibility to dextran sulfate sodium-induced colitis. *Cancer research*. 2006;66(24):11580-4.

106. Osburn WO, Karim B, Dolan PM, Liu G, Yamamoto M, Huso DL, et al. Increased colonic inflammatory injury and formation of aberrant crypt foci in Nrf2-deficient mice upon dextran sulfate treatment. *International Journal of Cancer*. 2007;121(9):1883-91.
107. Pareek TK, Belkadi A, Kesavapany S, Zaremba A, Loh SL, Bai L, et al. Triterpenoid modulation of IL-17 and Nrf-2 expression ameliorates neuroinflammation and promotes remyelination in autoimmune encephalomyelitis. *Scientific reports*. 2011;1(1):201.

8. Pubblicazioni

Le seguenti pubblicazioni sono state prodotte durante il periodo di dottorato (2022-2024):

- 1) **Tamburini, B.**, La Manna, M. P., La Barbera, L., Mohammadnezhad, L., Badami, G. D., Shekarkar Azgomi, M., ... & Caccamo, N. (2022). Immunity and nutrition: the right balance in inflammatory bowel disease. *Cells*, *11*(3), 455.
- 2) La Manna, M. P., Orlando, V., Badami, G. D., **Tamburini, B.**, Shekarkar Azgomi, M., Lo Presti, E., ... & Caccamo, N. (2022). Platelets accumulate in lung lesions of tuberculosis patients and inhibit T-cell responses and Mycobacterium tuberculosis replication in macrophages. *European Journal of Immunology*, *52*(5), 784-799.
- 3) Mohammadnezhad, L., Shekarkar Azgomi, M., La Manna, M. P., Sireci, G., Rizzo, C., Badami, G. D., **Tamburini, B.**, ... & Caccamo, N. (2022). Metabolic reprogramming of innate immune cells as a possible source of new therapeutic approaches in autoimmunity. *Cells*, *11*(10), 1663.
- 4) La Manna, M. P., Shekarkar Azgomi, M., **Tamburini, B.**, Badami, G. D., Mohammadnezhad, L., Dieli, F., & Caccamo, N. (2022). Phenotypic and Immunometabolic Aspects on Stem Cell Memory and Resident Memory CD8+ T Cells. *Frontiers in Immunology*, *13*, 884148.
- 5) La Manna, M. P., Shekarkar-Azgomi, M., Badami, G. D., **Tamburini, B.**, Dieli, C., Di Carlo, P., ... & Caccamo, N. (2022). Impact of mycobacterium tuberculosis infection on human B cell compartment and antibody responses. *Cells*, *11*(18), 2906.
- 6) **Tamburini, B.**, Badami, G. D., La Manna, M. P., Shekarkar Azgomi, M., Caccamo, N., & Dieli, F. (2023). Emerging roles of cells and molecules of innate immunity in Alzheimer's disease. *International journal of molecular sciences*, *24*(15), 11922.
- 7) Pratelli, G., **Tamburini, B.**, Carlisi, D., De Blasio, A., D'Anneo, A., Emanuele, S., ... & Di Liberto, D. (2023). Foodomics-Based Approaches Shed Light on the Potential Protective Effects of Polyphenols in Inflammatory Bowel Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(19), 14619.
- 8) Pratelli, G., **Tamburini, B.**, Badami, G. D., Lo Pizzo, M., De Blasio, A., Carlisi, D., & Di Liberto, D. (2024). Cow's Milk: A Benefit for Human Health? Omics Tools and Precision Nutrition for Lactose Intolerance Management. *Nutrients*, *16*(2), 320.
- 9) Shekarkar Azgomi, M., Badami, G. D., Lo Pizzo, M., **Tamburini, B.**, Dieli, C., La Manna, M. P., ... & Caccamo, N. (2024). Integrated Analysis of Single-Cell and Bulk RNA Sequencing Data Reveals Memory-like NK Cell Subset Associated with Mycobacterium tuberculosis Latency. *Cells*, *13*(4), 293.
- 10) Shekarkar Azgomi, M., Badami, G. D., Di Caro, M., **Tamburini, B.**, Fallo, M., Dieli, C., ... & Caccamo, N. (2024). Deep Immunoprofiling of Large-Scale

Tuberculosis Dataset at Single Cell Resolution Reveals a CD81bright $\gamma\delta$ T Cell Population Associated with Latency. *Cells*, 13(18), 1529.

- 11) Badami, G. D., **Tamburini, B.**, Mohammadnezhad, L., Vaz-Rodrigues, R., La Barbera, L., de la Fuente, J., & Sireci, G. (2024). Netosis and trained immunity in tick-borne diseases: a possible pathogenetic role. *Cellular Immunology*, 405, 104881.

9. RINGRAZIAMENTI

A mia moglie Valentina per il suo amore incondizionato e la pazienza infinita e a mia figlia Aurora Maria, la mia ispirazione più grande. In ogni momento siete state la mia luce e grazie a voi ho trovato la forza per raggiungere questo traguardo.

Desidero esprimere la mia più profonda gratitudine a tutte le persone che mi hanno supportato in questo percorso di dottorato, contribuendo al completamento di questa tesi.

In primo luogo, un ringraziamento sincero va alla Dott.ssa Diana Di Liberto, Co-tutor di fatto in tutto e per tutto, la sua guida costante, la pazienza e i consigli preziosi hanno orientato il mio lavoro e mi hanno permesso di superare le sfide incontrate lungo il cammino.

Ringrazio la Professoressa Nadia Caccamo, da sempre il mio mentore, la sua esperienza e professionalità sono sempre state un'ispirazione continua, guidandomi lungo tutto il mio percorso universitario dal lontano 2012.

Ringrazio la mia tutor la Professoressa Giuliana Guggino per la sua passione per la ricerca, il suo supporto è stato di grande aiuto in questi tre anni.

Un ringraziamento va anche alla Professoressa Marianna Lauricella per aver creduto nel progetto e avermi dato importanti spunti per il compimento della ricerca e ai colleghi che ho conosciuto a Biochimica, ogni interazione è stata una fonte di arricchimento personale e professionale.

Ringrazio anche il Professore Dieli e il Professore Sireci per il loro prezioso contributo scientifico negli anni in laboratorio e per l'incoraggiamento continuo.

Vorrei inoltre ringraziare i colleghi e amici del CLADIBIOR e non solo, che hanno condiviso con me momenti di confronto, stimolo e amicizia, contribuendo a rendere questo percorso di ricerca più ricco e piacevole. Grazie al Dott. Giovanni Pratelli per aver condiviso con me questa esperienza, regalandomi sempre una risata e una parola di conforto quando tutto sembrava non andare per il verso giusto. In particolare ringrazio i colleghi più cari come Marianna Lo Pizzo, Davide Badami, Shekarkar Mojtaba Azgomi, Marta Di Simone, Leila Mohammadnezhad, Miriam Sciortino, Francesca Buffa, Miriana Fallo, Cristina Aquilina, Maria Speciale e Fulvio Brucato, ormai tutti carissimi amici, in particolare Anna Maria Corsale che mi è stata di grande supporto nei vari percorsi di studi accademici, ricordandomi le scadenze importanti.

Un grazie speciale infine va alla mia famiglia, che mi ha sempre incoraggiato con amore e comprensione durante il mio lungo percorso di studio. A mia Mamma e mio fratello Alessandro, per il loro costante supporto e sostegno morale e per aver creduto da sempre in me anche nei momenti più complicati, e a mio Padre e mia Nonna Licia che da lassù non hanno mai smesso di tifare per me

A tutti voi, grazie di cuore.