



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato di Ricerca in Scienze Molecolari e Biomolecolari  
Dipartimento Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e  
Farmaceutiche

BIOS-07 – Biochimica

**ERIPTOSI INDOTTA DA FUMO DI SIGARETTA  
TRADIZIONALE E DI PRODOTTI DI NUOVA GENERAZIONE:  
INVESTIGAZIONE SUL MECCANISMO DI CITOTOSSICITÀ E  
DI PREVENZIONE**

Dottoranda  
**Dott.ssa ILENIA CONCETTA  
GIARDINA**

Tutor  
**Prof. MARIO ALLEGRA**

Coordinatore  
**Prof.ssa GIOVANNA PITARRESI**

Co-tutor  
**Prof. ALESSANDRO ATTANZIO**

CICLO XXXVII  
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2024

# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	4
1.1 Eriptosi.....	4
1.2 Meccanismi molecolari dell'eriptosi.....	5
1.3 Fumo di tabacco.....	8
1.4 Prodotti di fumo alternativo: e-CIG e THP.....	9
1.5 Impatto del fumo di tabacco sulla salute umana.....	12
1.6 Impatto dell'uso di prodotti di fumo alternativo sulla salute umana...	14
1.7 Correlazione tra fumo di tabacco ed eriptosi.....	17
1.8 Indicaxantina.....	20
<b>2. OBIETTIVO DELLA RICERCA</b> .....	25
2.1 Studio comparativo di citotossicità di estratti di fumo di sigaretta e di dispositivi di fumo alternativo.....	25
2.2 Studio del meccanismo di protezione dell'indicaxantina da <i>Opuntia ficus indica</i> su eriptosi estrinseca indotta da CSE.....	26
<b>3. MATERIALI E METODI</b> .....	27
3.1 Preparazione di CSE, THPE ed e-Cig.....	27
3.2 RBC e condizioni di trattamento.....	27
3.3 Estrazione e purificazione dell'indicaxantina.....	29
3.4 Analisi citofluorimetrica.....	29
3.4.1 Misura di esternalizzazione di PS.....	29
3.4.2 Misura di ceramide.....	30
3.4.3 Misura di ROS intracellulari.....	30
3.4.4 Misura di Ca <sup>2+</sup> intracellulare.....	31
3.4.5 Misura dell'attività della APL-translocasi (APLT).....	31
3.4.6 Misura di integrità della proteina Band 3.....	31
3.5 Immunoprecipitazione.....	32
3.6 Analisi western blot.....	32
3.7 Immunofluorescenza e Analisi Microscopica.....	33
3.7.1 Co-localizzazione FAS e Caspasi-8.....	33
3.7.2 Integrità Banda 3.....	34
3.8 Attività caspasi 3.....	34
3.9 Determinazione di ATP.....	35
3.10 Emolisi.....	35
3.11 Analisi statistica.....	36
<b>4. RISULTATI E DISCUSSIONE</b> .....	37
4.1 Studio comparativo di citotossicità di estratti di fumo di sigaretta e di dispositivi di fumo alternativo.....	37
4.1.1 THPE, ma non eCSE, promuove l'eriptosi in eritrociti umani isolati.....	37
4.1.2 Modifiche indotte da CSE e THPE della struttura proteica della membrana eritrocitaria.....	39
4.1.3 Studio del meccanismo dell'attività eriptotica di THPE...	43
4.1.4 Ricerca della componente del fumo responsabile dell'effetto eriptotico di CSE e THPE.....	47

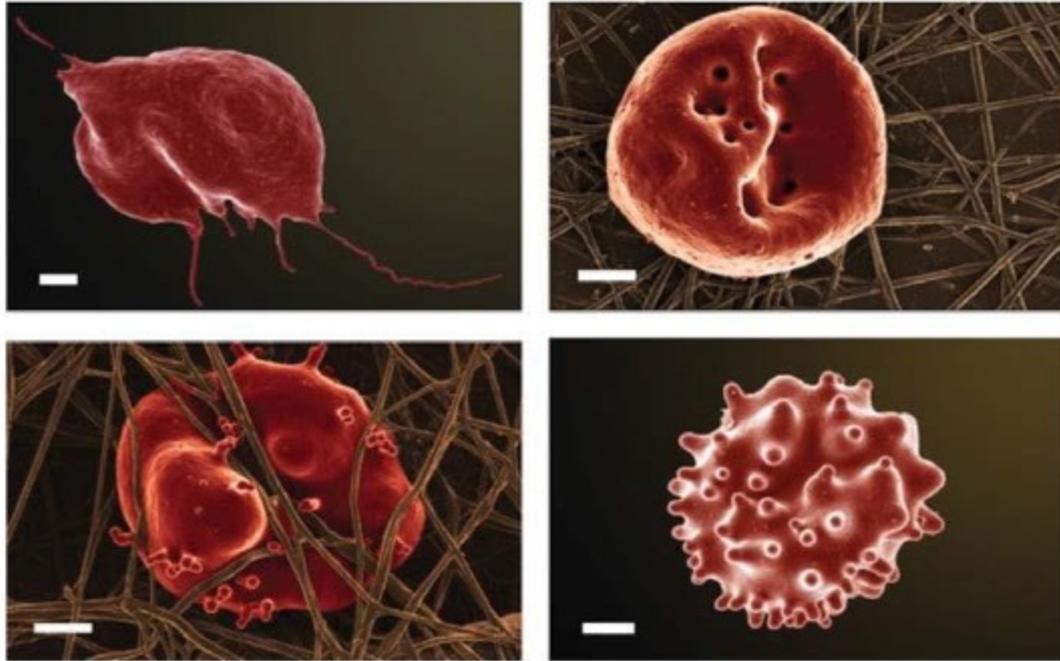
4.2 Studio del meccanismo di protezione dell'indicaxantina da <i>Opuntia ficus indica</i> su eriptosi estrinseca indotta da CSE.....	50
4.2.1 L'indicaxantina inibisce l'eriptosi indotta da CSE.....	50
4.2.2 L'indicaxantina inibisce l'assemblaggio del death-inducing signaling complex (DISC) indotto da CSE.....	52
4.2.3 L'indicaxantina inibisce l'attivazione delle caspasi e di p38 MAPK indotta da CSE.....	54
4.2.4 L'indicaxantina inibisce la deplezione di ATP indotta da CSE e la compromissione dell'attività di APLT.....	56
<b>5. CONCLUSIONI.....</b>	<b>59</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>61</b>

## INTRODUZIONE

### 1.1 ERIPTOSI

La durata media degli eritrociti maturi circolanti è di circa 100-120 giorni. L'eliminazione dei globuli rossi senescenti è mediata dall'attivazione del complemento e dalla proteina Banda 3 <sup>[1]</sup>, con la conclusione del processo emolitico ad opera dei macrofagi nella milza. In condizioni di stress particolari, i globuli rossi possono essere rimossi prima del termine della loro vita naturale attraverso un processo di morte cellulare programmata noto come eriptosi <sup>[2]</sup>. Fino a pochi anni fa, si riteneva che gli eritrociti non potessero subire morte cellulare programmata a causa della mancanza di nucleo e mitocondri, organelli cruciali nel mediare l'apoptosi. Tuttavia, recenti evidenze sperimentali hanno dimostrato l'esistenza dell'eriptosi, un processo che regola l'eliminazione degli eritrociti danneggiati o senescenti <sup>[3]</sup>. Questo processo rappresenta un meccanismo fisiologico simile all'apoptosi delle cellule nucleate. Dal punto di vista fisiologico, l'eriptosi è cruciale poiché previene l'emolisi intravasale degli eritrociti, consentendone l'eliminazione senza la lisi delle membrane e il conseguente rilascio di contenuto intracellulare che potrebbe provocare infiammazione <sup>[4]</sup>. L'eriptosi e i processi emopoietici giocano un ruolo fondamentale nel mantenimento del numero di eritrociti circolanti. Una disfunzione di questi processi può alterare la concentrazione di eritrociti e, di conseguenza, la capacità di ossigenazione dei tessuti. Negli individui sani esiste un equilibrio dinamico tra i processi emopoietici del midollo osseo, che rilascia eritroblasti, e i processi emocataretici, che attraverso i macrofagi rimuovono gli eritrociti senescenti. Questo equilibrio è regolato finemente dall'eritropoietina <sup>[5]</sup>. I segni distintivi dell'eriptosi includono lo shrinkage cellulare, il blebbing della membrana e l'esposizione della fosfatidilserina sul foglietto esterno della membrana. Gli stimoli più comuni che inducono eriptosi comprendono lo shock

iperosmotico <sup>[6]</sup>, la deplezione energetica <sup>[7]</sup>, lo stress ossidativo <sup>[8]</sup>, l'aumento della temperatura <sup>[9]</sup> e l'esposizione a vari xenobiotici. Tra le sostanze studiate come induttori dell'eriptosi vi sono gli ioni  $Al^{3+}$  <sup>[10]</sup>, l'amantadina<sup>[11]</sup>, l'amiodarone <sup>[12]</sup>, lo ione Cadmio <sup>[13]</sup>, l'acido  $\alpha$ -lipoico <sup>[14]</sup>, l'acroleina <sup>[15]</sup> e gli ossisteroli <sup>[16]</sup>.



**Figura 1.** Immagini di quattro stadi differenti del processo eriptotico<sup>[17]</sup>

## **1.2 MECCANISMI MOLECOLARI DELL'ERIPOTOSI**

Diversi meccanismi molecolari sono coinvolti nell'eriptosi. Il meccanismo predominante è l'aumento della concentrazione citoplasmatica di ioni  $Ca^{2+}$ , che si verifica a seguito di stress ossidativo, shock iperosmotico e deplezione di glucosio. In condizioni fisiologiche, l'omeostasi del  $Ca^{2+}$  è mantenuta tramite l'azione sinergica delle pompe per il  $Ca^{2+}$ , che sono meccanismi di estrusione ATP-dipendenti, e dei canali del Calcio, che consentono l'ingresso di  $Ca^{2+}$  extracellulare.

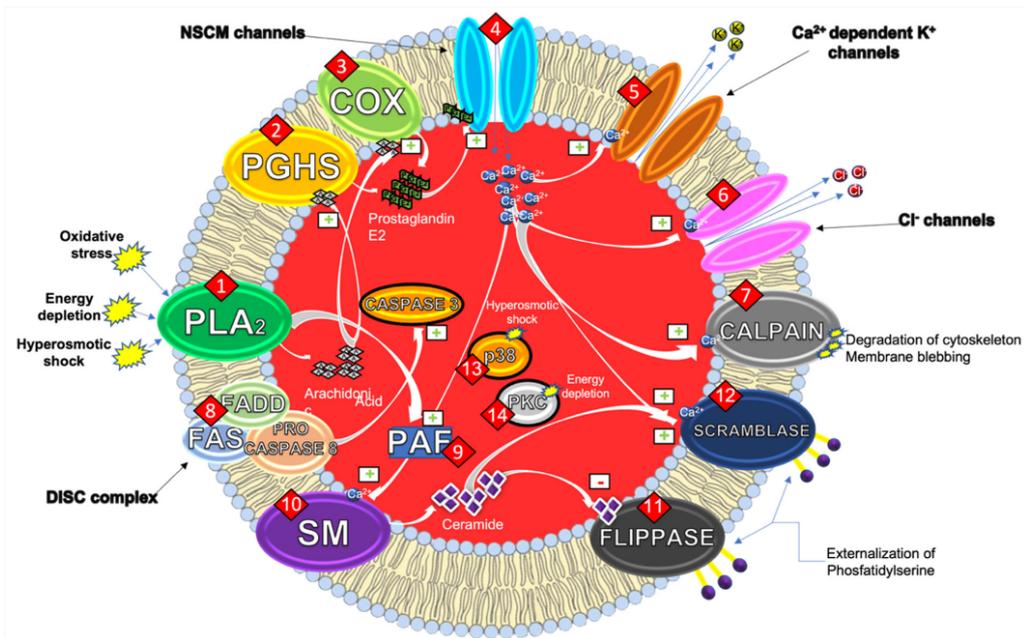


Figura 2. Diagramma che illustra le vie di segnalazione dell'eritrosi [18].

Stimoli pro-eritrotici attivano la fosfolipasi A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), che catalizza la liberazione di acido arachidonico (AA) mediante idrolisi del legame in posizione 2' dei fosfolipidi di membrana. L'AA è successivamente metabolizzato dalla prostaglandina endoperossido sintasi (PGHS), o ciclossigenasi (COX), a prostaglandina E<sub>2</sub>. Gli ioni Ca<sup>2+</sup> penetrano nel citosol dell'eritrocita attraverso canali cationici non selettivi, stimolati dalla PGE<sub>2</sub> [18]. L'aumento dei livelli di Ca<sup>2+</sup> induce l'attivazione dei canali del potassio (K<sup>+</sup>) dipendenti dal calcio, noti anche come canali di Gardos. Questa attivazione provoca l'uscita di ioni K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> dallo spazio intracellulare, risultando in un'iperpolarizzazione della membrana e una riduzione del volume cellulare (shrinkage) tipica degli eritrociti eritrotici [19].

L'aumento di Ca<sup>2+</sup> stimola anche la Calpaina, un'endopeptidasi cisteinica responsabile della degradazione del citoscheletro degli eritrociti e del blebbing di membrana, che contribuisce all'aumento dell'adesività degli eritrociti [20]. Sebbene le caspasi siano mediatori essenziali dell'apoptosi nelle cellule nucleate, negli eritrociti la  $\mu$ -calpaina è la proteasi principale coinvolta nel clivaggio di varie proteine di membrana, causando alterazioni morfologiche della cellula [21].

Nonostante sia stato dimostrato che le caspasi eritrocitarie sono funzionalmente attive in vitro, non era chiaro il ruolo della caspasi 8 nel processo eritotico, poiché non veniva attivata in risposta a molti stimoli eritotici [22]. Tuttavia, studi successivi hanno rivelato che le caspasi svolgono un ruolo funzionale negli eritrociti maturi, con fenomeni specifici come la traslocazione di FAS nei rafts di membrana, la formazione di un complesso associato a FAS, e l'attivazione delle caspasi 3 e 8, tutti indipendenti dall'attivazione della calpaina e stimolati da specie reattive dell'ossigeno come l'idroperossido di terz-butile o la fenilidrazina [23]. La perdita di ioni  $\text{Cl}^-$  determina un ulteriore rilascio di  $\text{PGE}_2$ , che aumenta i livelli intracellulari di  $\text{Ca}^{2+}$ . L'attivazione della  $\text{PLA}_2$  non solo porta alla produzione di  $\text{PGE}_2$ , ma stimola anche il rilascio del fattore attivante le piastrine (PAF). Il PAF è un potente attivatore della scramblasi, una proteina responsabile del trasferimento dei fosfolipidi tra i due strati del doppio strato lipidico della membrana plasmatica, e contribuisce alla sua attivazione insieme alla produzione di  $\text{PGE}_2$ . Inoltre, il PAF stimola l'attività della sfingomielinasi di membrana. Le sfingomielinasi, enzimi ubiquitari, catalizzano l'idrolisi della sfingomielina della membrana cellulare, generando ceramide, un lipide che agisce da secondo messaggero intracellulare sia nel differenziamento cellulare che nell'apoptosi. L'aumento del ceramide in membrana, insieme al  $\text{Ca}^{2+}$ , determina l'attivazione delle scramblasi e l'inibizione delle flippasi. Queste, a differenza delle scramblasi, sono proteine transmembrana selettive: rimuovono determinati fosfolipidi dal foglietto esterno della membrana e li capovolgono nel foglietto esposto verso il citosol. L'effetto finale dell'attivazione delle scramblasi e la simultanea inibizione delle flippasi, fa sì che la fosfatidilserina (PS) resti esternalizzata. Questo meccanismo potrebbe avere un ruolo chiave per la caratteristica adesività riscontrata negli eritrociti eritotici che può essere causa di compromissioni a livello del microcircolo [24, 27].

Altri studi hanno rivelato che la deplezione energetica può ridurre l'attività della Calcio-ATPasi, diminuendo l'efflusso di  $\text{Ca}^{2+}$  e aumentando così la sua concentrazione nel citosol, il che innesca i meccanismi precedentemente descritti. La carenza energetica riduce anche l'attività enzimatica della glutatione reduttasi, che rigenera il glutatione ridotto (GSH), portando a una deplezione delle difese antiossidanti degli eritrociti e a una maggiore suscettibilità allo stress ossidativo. In condizioni normali di energia, la fosfatidilserina è mantenuta nel versante interno della membrana grazie all'attività ATP-dipendente della flippasi. Una riduzione di quest'attività comporta un aumento della PS esternalizzata. Studi recenti hanno anche indicato il coinvolgimento della proteina chinasi p38 nel meccanismo che innesca l'eritrosi in risposta a shock iperosmotico [28]. Infine, la deplezione energetica può portare all'attivazione della proteina chinasi C (PKC), una serina/treonina chinasi che, fosforilando proteine di membrana, stimola l'eritrosi [8 - 29]. Tutti questi meccanismi convergono nel mantenere la PS sulla superficie esterna della membrana. La perdita della simmetria della membrana e l'esternalizzazione della PS stimolano la fagocitosi da parte dei macrofagi, che assicurano la rimozione degli eritrociti eritrotici dalla circolazione sanguigna [30].

### **1.3 FUMO DI TABACCO**

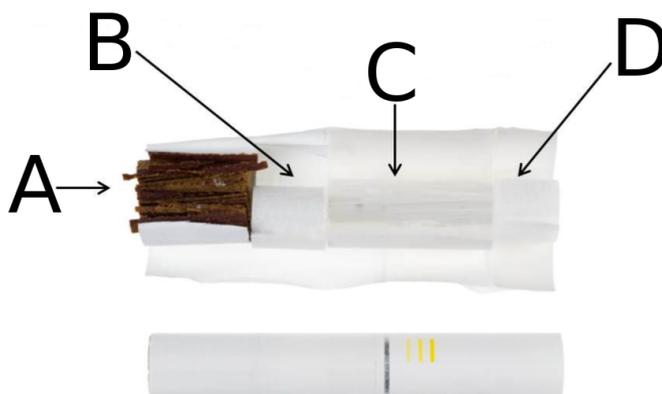
Il fumo di tabacco è riconosciuto come una delle principali cause di molte patologie e danni alla salute umana, costituendo la principale causa prevenibile di mortalità, con oltre sei milioni di decessi annuali a livello globale. Numerosi studi degli ultimi decenni hanno esaminato l'impatto negativo del fumo sulla salute, attribuendolo alle varie sostanze tossiche e ai prodotti di combustione presenti nel fumo stesso. La pianta del tabacco, appartenente alla famiglia delle Solanacee, è originaria dell'America del Sud e si è diffusa a livello mondiale. La composizione chimica del fumo di tabacco è influenzata da molteplici fattori, tra cui i metodi di coltivazione,

l'uso di fertilizzanti e pesticidi, le varietà di tabacco e le lavorazioni effettuate dopo la raccolta. Durante la combustione del tabacco, che raggiunge temperature di circa 800°C, si generano oltre 3900 sostanze, tutte considerate nocive per la salute umana<sup>[31]</sup>. Il fumo di tabacco è un aerosol complesso composto da una fase gassosa e una fase particolata, contenente i suoi costituenti principali. Tra questi, nella fase particolata si trovano la nicotina, il catrame, gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) e le nitrosammine specifiche del tabacco (NTS). Nella fase gassosa, invece, si ritrovano idrocarburi a basso peso molecolare come benzene, butadiene e toluene, mentre l'acido cianidrico e l'ammoniaca sono presenti in entrambe le fasi<sup>[32]</sup>. La direttiva europea 2001/37/CE, recepita in Italia con il decreto legislativo n. 184 del 24 giugno 2003 e pubblicata nella Gazzetta Ufficiale n. 169 del 23 luglio 2003, ha stabilito limiti massimi per il catrame (10 mg per sigaretta) e introdotto per la prima volta limiti per la nicotina (1 mg per sigaretta) e per il monossido di carbonio (10 mg per sigaretta). Inoltre, il fumo di sigaretta contiene due gruppi distinti di radicali liberi: radicali a lunga vita nella fase particolata e radicali a vita breve nella fase gassosa. Il principale radicale nella fase particolata è costituito dal complesso chinone-idrochinone, un sistema redox molto reattivo che può ridurre l'ossigeno molecolare a radicale superossido, successivamente convertito in perossido di idrogeno e radicale idrossilico. Nella fase gassosa del fumo, si trovano invece piccoli radicali alchilici e alcossilici, che possiedono una reattività notevolmente superiore rispetto ai radicali presenti nella fase particolata<sup>[33]</sup>.

#### **1.4 PRODOTTI DI FUMO ALTERNATIVO: e-CIG E THP**

Come già riportato, il fumo di sigaretta è riconosciuto come una delle principali cause prevenibili di mortalità in tutto il mondo. Le strategie preventive si sono concentrate per decenni sulla prevenzione dell'iniziazione al fumo e sulla promozione della cessazione del fumo. Tuttavia, recenti scoperte hanno portato alla

luce una terza tecnica per ridurre i danni causati dal fumo: l'adozione di prodotti considerati meno dannosi perché bruciano il tabacco a temperature più basse. A partire dagli inizi degli anni 2000, le industrie del tabacco, tra cui Philip Morris International, hanno sviluppato e sostenuto i "next generation products" (NGP), che includono dispositivi per il riscaldamento del tabacco (THP) e sigarette elettroniche (e-Cig). Le sigarette elettroniche funzionano riscaldando e vaporizzando una soluzione liquida che contiene glicole propilenico (PG), glicerolo vegetale (VG), nicotina e spesso aromi. I THP, al contrario, producono aerosol riscaldando un piccolo componente chiamato *heatstick* a circa 350 °C <sup>[34]</sup>, a differenza della combustione diretta del tabacco a 800 °C. Il contenuto di sostanze nocive associate alla combustione viene notevolmente ridotto attraverso questo processo <sup>[35]</sup>.



**Figura 3.** Stick di tabacco A: Film di tabacco ricostituito, costituito da tabacco essiccato (70%), umettanti (acqua e glicerina) per favorire la formazione di aerosol, agenti leganti e agenti aromatici. B: Tubo cavo in acetato. C: Filtro a film polimerico che raffredda l'aerosol. D: Bocchino in morbido acetato di cellulosa, che imita la sensazione di una sigaretta tradizionale.

Nel dettaglio, i THP impiegano un tappo di tabacco all'interno di un tubo cavo di acetato, dotato di filtri in pellicola polimerica e acetato di cellulosa. Il tappo di tabacco in questi dispositivi pesa circa 320 mg, rispetto ai 550-700 mg di filler presenti nelle sigarette tradizionali, contribuendo a una riduzione significativa delle emissioni tossiche. Alla fine degli anni '80, un prodotto simile, il Premier di RJ

Reynolds <sup>[36]</sup>, dimostrava basse emissioni ambientali e poteva fornire nicotina se utilizzato intensivamente in un ambiente di laboratorio. Tuttavia, la sua accettabilità era limitata a causa del sapore sgradevole e delle difficoltà legate all'uso quotidiano <sup>[37]</sup>. Recentemente, l'IQOS, sviluppato da Philip Morris International, ha fatto il suo ingresso sul mercato come un dispositivo di riscaldamento del tabacco che non brucia il prodotto <sup>[38]</sup>. Diversamente dai predecessori Premier ed Eclipse, l'IQOS è costituito da un dispositivo a batteria con una piastra metallica riscaldante e un breve bastoncino di tabacco inserito nel sistema. Questo prodotto preriscalda il bastoncino per circa 20 secondi e mantiene una temperatura sufficiente a produrre aerosol per tutta la durata dell'utilizzo, fino all'esaurimento della batteria.



**Figura 4.** Prodotto heat-not-burn testato in questo studio (iQOS), composto da un caricabatterie (A), il dispositivo (B) e la scatola di bastoncini di tabacco (C).

In contrasto, le e-Cig producono calore solo quando sono attivate e la temperatura della serpentina può abbassarsi fino ai livelli ambientali tra un tiro e l'altro. Una parte significativa dell'energia per ogni tiro successivo viene utilizzata per riscaldare la serpentina fino al punto di evaporazione del liquido <sup>[39]</sup>. Sebbene le sigarette elettroniche siano generalmente considerate un'alternativa più sicura

rispetto alle sigarette tradizionali, poiché non contengono tabacco e producono un aerosol senza combustione, la loro sicurezza complessiva rimane oggetto di indagini. Le e-cig vaporizzano liquidi contenenti glicole propilenico, glicerolo, nicotina e aromi a temperature di circa 200–250 °C <sup>[40]</sup>.

Tuttavia, è cruciale riconoscere che alcuni dispositivi per sigarette elettroniche possono produrre prodotti di pirolisi, come aldeidi reattive e specie ossidanti, analoghi a quelli generati dalla combustione del tabacco. Questo suggerisce che, sebbene le e-Cig possano presentare un profilo di rischio inferiore rispetto alle sigarette convenzionali, non sono privi di potenziali rischi correlati <sup>[41]</sup>.



**Figura 5.** Tipologia di sigaretta elettronica testata in questo studio (eCig)

## **1.5 IMPATTO DEL FUMO DI TABACCO SULLA SALUTE UMANA**

Numerose sostanze presenti nel fumo di sigaretta hanno dimostrato capacità cancerogene, agendo sia come agenti iniziatori nello sviluppo di tumori che come promotori della loro crescita. Le mutazioni cellulari indotte da tali sostanze rendono il fumo di tabacco una delle principali cause di carcinoma polmonare <sup>[42]</sup>. Tuttavia, le implicazioni fisiopatologiche del fumo di tabacco si estendono ben oltre il cancro polmonare. Studi recenti hanno evidenziato che il fumo di tabacco può indurre reflusso gastroesofageo, riducendo la pressione di riposo dello sfintere esofageo

inferiore di circa il 37% entro due o tre minuti dall'esposizione <sup>[43]</sup>. Inoltre, il fumo di sigaretta può alterare significativamente il microbioma umano, influenzando negativamente i microbiomi parodontale, gastrointestinale e respiratorio. I fumatori presentano, in generale, una maggiore abbondanza di batteri anaerobi nel loro microbioma gastrointestinale rispetto ai non fumatori, suggerendo che la natura immunosoppressiva del tabacco possa alterare la composizione microbica <sup>[44]</sup>. Il fumo di tabacco è altresì associato a modifiche dell'epitelio bronchiale, compromettendo la funzione muco-ciliare e favorendo lo sviluppo di bronchite cronica. I radicali liberi presenti nel fumo accelerano il danno respiratorio, contribuendo alla progressione della bronchite cronica verso l'enfisema <sup>[45]</sup>. Inoltre, il fumo di sigaretta è implicato nello sviluppo di infiammazione cronica, allergie, asma e altre patologie polmonari <sup>[46]</sup>. Altri studi hanno rivelato una correlazione tra il consumo di tabacco e un incremento del rischio di sviluppare iperplasia prostatica e disfunzione erettile <sup>[47]</sup>. Gli impatti maggiori del fumo sono a carico dell'apparato cardiovascolare. È riconosciuto come uno dei principali fattori di rischio per lo sviluppo di aterosclerosi. Il meccanismo patologico alla base di questa condizione inizia con uno stato di stress ossidativo che stimola l'endotelio vascolare, inducendo l'espressione di molecole di adesione e il reclutamento di macrofagi e piastrine. Questo stress ossidativo riduce i livelli di ossido nitrico (NO) nelle cellule endoteliali, alterando l'equilibrio tra sostanze vasodilatatrici e vasocostrittrici e compromettendo la funzione delle cellule muscolari lisce dei vasi sanguigni. In risposta all'esposizione al fumo, le cellule endoteliali rilasciano citochine infiammatorie e pro-aterogene, contribuendo alla disfunzione endoteliale. I composti del fumo e le specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto (RONS) causano danni diretti alle cellule endoteliali, portando ad apoptosi o necrosi. Inoltre, l'espressione dei recettori delle molecole di adesione sui macrofagi favorisce

l'adesione e la migrazione attraverso l'endotelio, permettendo l'assorbimento di lipidi ossidati mediato dai recettori scavenger. Questo processo conduce alla formazione di cellule schiumose all'interno della parete aortica, la cui successiva morte rilascia lipidi e contribuisce alla formazione di placche aterosclerotiche. Il fumo induce anche un aumento della proliferazione e della migrazione delle cellule muscolari lisce, favorendo l'ispessimento della tonaca intima e la formazione di placche. La necrosi delle cellule muscolari lisce stimola segnali infiammatori e il rilascio di enzimi proteolitici intracellulari, che degradano le proteine della matrice extracellulare. L'aumento dell'espressione delle metalloproteasi della matrice (MMP) e la ridotta espressione dei loro inibitori amplificano ulteriormente la distruzione della matrice extracellulare <sup>[48]</sup>. Oltre all'aterosclerosi, il fumo di sigaretta è associato a un maggiore rischio di ospedalizzazione per insufficienza cardiaca. In passato, il fumo era considerato un predittore non significativo di fibrillazione atriale (FA), ma nuove evidenze indicano che è in realtà un importante fattore di rischio per questa aritmia. L'associazione tra fumo e tromboembolia venosa (TEV) resta controversa; nei forti fumatori, la TEV si verifica frequentemente in seguito allo sviluppo di cancro o infarto del miocardio, rendendo difficile isolare gli effetti specifici del fumo su questa patologia <sup>[49]</sup>.

## **1.6 IMPATTO DELL'USO DI PRODOTTI DI FUMO**

### **ALTERNATIVO SULLA SALUTE UMANA**

#### **Sigarette elettroniche (e-Cig)**

Comprendere la tossicologia dei liquidi per e-Cig è complicato anche per l'utilizzo di liquidi non regolamentati e fatti in casa. Alcuni utenti, infatti, considerano le e-Cig come un hobby, producendo i propri liquidi e fabbricando su misura i dispositivi. I contenuti di queste formulazioni di liquidi sono completamente sconosciuti e privi di regolamentazione <sup>[50]</sup>.

Il CDC (Centers for Disease Control and Prevention) negli Stati Uniti ha segnalato, in un solo anno, oltre 2800 casi di lesioni polmonari correlate al vaping e più di 60 decessi. Le indagini effettuate hanno messo in luce lesioni polmonari acute tossiche, come pneumonite fibrinosa, danno alveolare diffuso e polmonite organizzativa [51,54]. La cessazione dell'utilizzo dei dispositivi ha portato miglioramenti clinici nella maggior parte dei pazienti [55]. Tra i componenti che presentano una maggiore tossicità vi è il diacetile. Quest'ultimo viene utilizzato negli aromi dei liquidi, ed è stato associato a bronchiolite obliterante [56]. Sebbene il diacetile sia stato identificato come un possibile fattore causale, il suo ruolo preciso rimane incerto, poiché è stato rilevato anche nel fumo di sigaretta senza un aumento significativo dei casi di bronchiolite obliterante tra i fumatori [57]. I produttori di liquidi hanno iniziato a pubblicizzare prodotti "senza diacetile", ma alcune formulazioni contengono ancora il composto [58,60]. Alcuni studi, inoltre, suggeriscono che le e-Cig possono peggiorare le malattie polmonari ostruttive. In uno studio, i partecipanti che avevano usato e-Cig erano due volte più propensi a manifestare sintomi di bronchite rispetto a quelli che non avevano mai usato e-Cig [61]. In laboratorio, l'uso di e-Cig ha alterato la funzione polmonare e l'infiammazione nei pazienti asmatici [62]. Studi su animali hanno dimostrato che i topi esposti ai fluidi delle e-Cig presentano un aumento dell'iperattività delle vie aeree e altre alterazioni polmonari [63]. L'utilizzo quotidiano di e-Cig è stato associato a un aumento del rischio di infarto miocardico, nonostante tale rischio sia relativamente inferiore rispetto all'uso quotidiano di sigarette convenzionali [64]. L'uso delle e-Cig è stato anche associato a un aumento della frequenza cardiaca e della pressione sanguigna [65], aumento di stress ossidativo [66] e alterazioni del flusso vascolare [67]. In topi esposti a e-Cig contenenti nicotina, le cellule cardiache hanno presentato caratteristiche strutturali indicative di cardiomiopatia [68]. Le cellule endoteliali

esposte a diversi e-liquids hanno mostrato vari tipi di danno cellulare, tra cui una minore vitalità cellulare e un aumento della formazione di ROS <sup>169</sup>. Il vaping ha un rapporto rischio-beneficio significativamente diverso negli adolescenti, che sono esposti per la prima volta alla nicotina e non utilizzano le e-Cig con l'intento di smettere di fumare; tuttavia, negli adulti che utilizzano tali dispositivi come ausilio per la cessazione del fumo, può comportare una riduzione del rischio cardiovascolare <sup>170</sup>.

### **Dispositivi per il riscaldamento del tabacco (THP)**

Per quanto riguarda i dispositivi per il riscaldamento del tabacco, la maggior parte degli studi, ad oggi, sono stati effettuati sul dispositivo commercializzato da Philip Morris, la quale afferma che iQOS è meno dannoso rispetto alle sigarette tradizionali. Tuttavia, questa affermazione non trova riscontro negli studi clinici effettuati della stessa azienda. Per citare qualche esempio, in una coorte americana di 88 utenti, suddivisi in consumatori di THP, fumatori di sigarette convenzionali e non fumatori, solo uno dei 24 biomarker ha mostrato miglioramenti rilevanti rispetto al consumo di sigarette tradizionali. Tra i biomarker che mostravano lievi miglioramenti passando a iQOS, si riscontra un aumento dei livelli di lipoproteine ad alta densità e una riduzione di alcuni indicatori infiammatori (conteggio dei globuli bianchi, ICAM-1 solubile e prostaglandina F<sub>2α</sub>) <sup>171</sup>. Sia gli studi *in vivo* che quelli *in vitro* suggeriscono effetti negativi sulla salute cardiovascolare. In uno studio effettuato su fumatori suddivisi in consumatori di sigarette tradizionali, e-Cig e THP, tutti e tre i trattamenti inducevano un aumento significativo della proteina NADPH ossidasi-2 nel sangue, come indicatore di stress ossidativo. Inoltre, veniva riscontrata una significativa riduzione della dilatazione mediata dal flusso, indicatore di disfunzione endoteliale vascolare <sup>172</sup>. Questi risultati clinici vengono confermati da studi *in vivo* in ratti esposti a iQOS o al fumo di sigaretta,

che mostrano un'inibizione della dilatazione mediata dal flusso arterioso. In macrofagi murini RAW 264.7 esposti agli aerosol di THP si riscontrava un aumento dello stress ossidativo (elevati livelli di ROS e GSH) in maniera tempo e dose-dipendente, sebbene in quantità inferiore rispetto a quelli riscontrati in macrofagi esposti al fumo di sigaretta <sup>173</sup>. Un altro studio condotto su 22 fumatori senza comorbidità ha mostrato effetti acuti simili dei dispositivi THP e delle sigarette tradizionali su un pannello di valutazioni cardiovascolari: frequenza cardiaca, pressione sanguigna, velocità dell'onda di pulsazione carotidea-femorale e velocità dell'onda di pulsazione brachiale-caviglia. Questi risultati erano significativamente elevati rispetto ai valori basali, suggerendo che i THP potrebbero indurre rigidità arteriosa <sup>174</sup>. In un altro studio *in vivo*, i ratti esposti a iQOS mostravano infiammazione polmonare. Inoltre, gli esseri umani che passano dalle sigarette combustibili a iQOS non mostravano miglioramenti nella funzione polmonare o nell'infiammazione <sup>175</sup>. Dopo l'uso di iQOS, uno studio clinico su fumatori sani e non fumatori ha mostrato un aumento della resistenza delle vie aeree e significative riduzioni acute della funzione polmonare <sup>176</sup>. Inoltre, studi *in vitro* con aerosol di iQOS hanno dimostrato che la citotossicità colpisce le cellule epiteliali bronchiali umane e altre cellule del sistema respiratorio <sup>177,78</sup>.

Infine, occorre sottolineare che la letteratura scientifica in merito è ancora scarsa e in continua evoluzione, infatti ulteriori effetti nocivi sulla salute potrebbero emergere con studi più approfonditi sui prodotti THP.

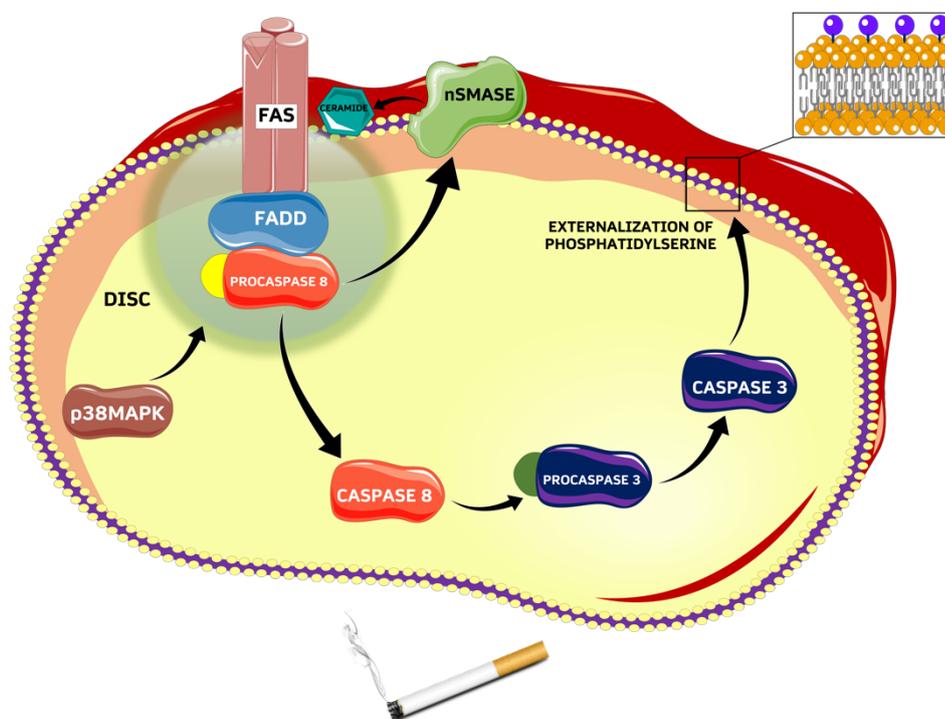
## **1.7 CORRELAZIONE TRA FUMO DI TABACCO ED ERIPTOSI**

Numerosi studi hanno dimostrato che l'aumento dei livelli di sostanze ossidanti derivanti dal fumo di tabacco, associato a una ridotta capacità antiossidante totale nel sangue dei fumatori, suggerisce che le tossine del fumo possono diffondersi nella circolazione sanguigna, causando danni cellulari. Questi danni includono

l'emolisi dei globuli rossi, alterazioni fisico-chimiche della membrana degli eritrociti, perossidazione lipidica e infiammazione <sup>179</sup>. Il fumo di sigaretta è stato anche associato a modifiche dei parametri ematologici e lipidici, come l'aumento dei livelli di emoglobina, ematocrito, conta leucocitaria totale, colesterolo totale, trigliceridi, LDL e VLDL, e una riduzione dei livelli di HDL <sup>180, 81</sup>. Inoltre, nei fumatori sono stati osservati elevati livelli di proteina C-reattiva (CRP), un marcatore sierico non specifico di infiammazione sistemica <sup>182</sup>. *In vivo*, il fumo di sigaretta ha rivelato un aumento dell'emolisi degli eritrociti e dei livelli di specie reattive dell'ossigeno (ROS), una diminuzione dei gruppi sulfidrilici (-SH), e modifiche nella fluidità della membrana e nella morfologia degli eritrociti rispetto ai non fumatori <sup>183</sup>. Nonostante le differenze osservate tra fumatori e non fumatori riguardanti biomarcatori legati allo stress ossidativo, all'infiammazione e ai parametri lipidici, non era stata precedentemente dimostrata un'aumentata eriptosi nei fumatori. Tuttavia, uno studio recente ha correlato i livelli di eriptosi con il fumo di sigaretta <sup>184</sup>. Questo studio ha avuto come obiettivo l'analisi dell'effetto del fumo di tabacco sull'esternalizzazione della fosfatidilserina negli eritrociti, un indicatore chiave dell'eriptosi. Non sono state riscontrate modifiche significative nei parametri ematologici, ma è stato osservato un incremento della conta leucocitaria nei fumatori, suggerendo una condizione di infiammazione sistemica. Il livello di proteina C-reattiva (PCR), un biomcatore dell'infiammazione, era significativamente più elevato nel gruppo dei fumatori rispetto ai non fumatori e mostrava una correlazione positiva con la percentuale di eritrociti eriptotici. Questo studio ha quindi dimostrato una relazione tra stato di infiammazione sistemica ed eriptosi nei fumatori. Contrariamente alle aspettative, non è stata osservata una minore resistenza all'emolisi nei fumatori moderati rispetto ai controlli, il che potrebbe essere attribuito all'aumento dell'ossido nitrico e degli enzimi

antiossidanti (catalasi, superossido dismutasi e glutatione perossidasi), che potrebbero neutralizzare i radicali liberi prodotti dal fumo e proteggere le cellule dall'emolisi. Inoltre, sono state osservate riduzioni dei livelli di glutatione ridotto (GSH) nei globuli rossi dei fumatori moderati e negli eritrociti esposti a nicotina e cotinina *ex vivo* [84]. Questi risultati suggeriscono che lo stato infiammatorio e l'ambiente ossidativo indotti dal fumo di sigaretta sono associati a un aumento dell'eritrosi, una relazione che potrebbe essere implicata nella patogenesi delle malattie cardiovascolari nei fumatori. Queste ultime evidenze hanno sollevato interrogativi su come il fumo possa stimolare questo processo e quali siano i meccanismi coinvolti. A tal fine, uno studio condotto presso il laboratorio di Biochimica del Dipartimento STEBICEF dell'Università degli Studi di Palermo ha utilizzato un modello di estratto di fumo di sigaretta (CSE) per indagare i meccanismi con cui il fumo di sigaretta danneggia i globuli rossi (RBC). In questo studio, il trattamento dei globuli rossi umani con CSE induceva l'esternalizzazione della fosfatidilserina (PS) in modo dose-dipendente, accompagnata da una diminuzione del volume cellulare, indicativa di morte cellulare. Tuttavia, il CSE non influenzava i livelli cellulari di  $Ca^{2+}$  né ha indotto uno squilibrio redox, valutato tramite l'analisi delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) o del glutatione ridotto (GSH). È stato rivelato che il CSE induce un pathway eritrotico estrinseco, caratterizzato dall'oligomerizzazione del recettore FAS e dall'assemblaggio del Death-Inducing Signaling Complex (DISC), con successiva attivazione delle caspasi 8 e 3 entro 6 ore dal trattamento. Inoltre, il CSE ha provocato una sovrapproduzione di ceramide, dipendente dall'attività della sfingomielinasi neutra, e la fosforilazione della p38 MAPK. L'inibizione specifica di p38 MAPK ha dimostrato che l'attivazione di questa chinasi è necessaria per l'attivazione del pathway di morte mediata da recettore. L'analisi *ex vivo* su eritrociti di soggetti

fumatori e non fumatori ha confermato la maggiore presenza di p38 MAPK fosforilata, di FADD e di caspasi-8 in membrana dei globuli rossi dei fumatori, sottolineando la rilevanza di questi meccanismi *in vivo*. In sintesi, lo studio ha dimostrato che l'esposizione al fumo di sigaretta induce un pathway apoptotico estrinseco negli eritrociti, mediato dall'assemblaggio del DISC, attivato da p38 MAPK e seguito dall'attivazione delle caspasi 8 e 3 tramite la formazione di ceramide. Questi risultati forniscono una comprensione più dettagliata dei meccanismi attraverso i quali il fumo di sigaretta può danneggiare i globuli rossi [85].

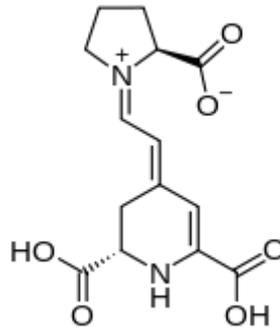


**Figura 6.** Immagine riassuntiva del pathway di eritrosi estrinseca indotto da CSE

## 1.8 INDICAXANTINA

L'avanzamento nella comprensione della biologia redox [86] ha suscitato un interesse crescente sugli effetti sulla salute e sui meccanismi d'azione delle sostanze fitochimiche redox-attive presenti nella nostra alimentazione quotidiana. I fitochimici costituiscono un gruppo di composti appartenenti ai metaboliti

secondari delle piante. La loro biosintesi avviene in risposta a condizioni ambientali sfavorevoli o a stimoli di stress esogeni che provocano un incremento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), modificando l'equilibrio redox della pianta. Tali molecole, che si integrano nel potente sistema antiossidante composto da enzimi, proteine redox e piccole molecole come il GSH e le vitamine antiossidanti, svolgono un ruolo cruciale nel mantenimento dell'omeostasi redox della pianta <sup>187-89]</sup>. In accordo con il principio dell'ormesi, queste molecole rappresentano una risposta adattativa delle piante a condizioni di stress e ambienti pro-ossidanti <sup>188]</sup>. A loro volta, esse agiscono come xenobiotici, attivando risposte riparative mirate al ripristino dell'equilibrio redox cellulare <sup>190-93]</sup>, conferendo così maggiore resilienza all'organismo che le assimila. In un approccio parallelo ma complementare, la capacità dell'organismo di gestire e sfruttare il potenziale delle sostanze fitochimiche è inquadrata nel concetto di omeostasi adattativa <sup>194]</sup>. Secondo tale concetto, l'omeostasi cellulare è un processo dinamico che scaturisce da un adattamento continuo e transitorio a lievi stress, i quali attivano risposte citoprotettive, preparando l'organismo a reagire meglio a futuri stress senza provocare danni immediati o richiedere processi riparativi. I fitochimici possono indurre effetti benefici a livello cellulare modulando le vie di segnalazione redox-dipendenti, le quali a loro volta regolano l'attivazione di fattori di trascrizione e geni coinvolti nella detossificazione di fase II, nel mantenimento dell'equilibrio redox cellulare e in altre forme di difesa cellulare <sup>191,95]</sup>. Inoltre, è stato dimostrato che questi composti sono in grado di influenzare l'espressione proteica mediante meccanismi di modulazione epigenetica, configurandosi come una strategia avanzata per fornire protezione a lungo termine <sup>196]</sup>. Un fitochimico di crescente interesse, grazie alle sue caratteristiche uniche, è l'indicaxantina.



**Figura 7.** Struttura molecolare dell'indicaxantina

L'indicaxantina (IND) è una betaxantina, un pigmento vegetale appartenente alla famiglia delle betalaine, composti idrosolubili presenti in determinate specie vegetali. La più alta concentrazione di indicaxantina è stata rilevata nel frutto del cactus *Opuntia ficus-indica* (L. Mill), comunemente noto come fico d'India, una pianta che prospera in numerosi ambienti ostili, dai climi caldi e aridi del Messico a specifiche regioni dell'Africa, dell'Asia e del bacino del Mediterraneo <sup>[97]</sup>. L'Indicaxantina è il principale pigmento responsabile della caratteristica colorazione giallo-arancio della polpa del frutto, e la sua concentrazione può variare in funzione del grado di maturazione del frutto, delle condizioni ambientali e delle specifiche varietà del cactus <sup>[98]</sup>.



**Figura 8.** L'indicaxantina è il pigmento giallo-arancio tipico del frutto di fico d'india.

IND è un fitochimico di crescente interesse per le sue spiccate proprietà antiossidanti e il potenziale impiego come terapia di supporto nei pazienti affetti da talassemia. Studi recenti hanno esaminato gli effetti protettivi di questo pigmento sui globuli rossi beta-talassemici umani esposti a emolisi ossidativa in vitro, indotta da cumene idroperossido. I risultati hanno evidenziato che l'Indicaxantina migliora significativamente la resistenza all'emolisi in modo dose-dipendente. Inoltre, si è osservato che è in grado di prevenire l'ossidazione dei lipidi e dell'emoglobina (Hb), e ritarda la deplezione di antiossidanti chiave come la vitamina E e il glutatione (GSH), supportando così il sistema antiossidante endogeno della cellula <sup>[99]</sup>. Inoltre, è stato dimostrato che l'IND è in grado di inibire la disfunzione delle cellule endoteliali umane mediata dalle LDL ossidate attraverso l'inibizione dell'attivazione di NF-κB <sup>[98]</sup>. L'indicaxantina inibisce l'attivazione della NADPH ossidasi e il rilascio di mediatori infiammatori NF-κB-dipendenti, prevenendo inoltre l'aumento della permeabilità epiteliale in cellule Caco-2 stimulate con IL-1β <sup>[100]</sup>. È inoltre un efficace scavenger dei radicali lipoperossilici, con effetti antiossidanti nei liposomi che sembrano dipendere dalle sue interazioni con il bilayer fosfolipidico <sup>[101]</sup>. È stato dimostrato che l'IND, dopo l'ingestione, può accumularsi nelle LDL <sup>[102]</sup> e nei globuli rossi, dove è in grado di aumentare la resistenza delle cellule all'emolisi ossidativa indotta *ex vivo* nell'uomo <sup>[103]</sup>. Dopo aver indagato sugli effetti anti-apoptotici della molecola in cellule nucleate <sup>[104, 105]</sup>, è stato effettuato uno studio sulla morte programmata dei globuli rossi. In quel lavoro, l'IND utilizzata fino alla concentrazione di 5 μM, preveniva l'eriptosi indotta da una miscela di ossisteroli alle concentrazioni che mimavano una condizione di ipercolesterolemia, riducendo i livelli di fosfatidilserina esposta sul versante esterno di membrana e diminuendo l'adesione degli eritrociti ai monostrati cellulari endoteliali <sup>[106]</sup>. Dal punto di vista nutrizionale, l'Indicaxantina è altamente

biodisponibile nell'uomo, grazie a diversi fattori che influenzano il suo assorbimento <sup>[107]</sup>. In studi condotti su volontari che hanno consumato 500 g di polpa di fico d'India (pari a 28 mg di Indicaxantina), è stato riscontrato un elevato assorbimento della molecola. Il picco plasmatico di  $6,9 \pm 0,54 \mu\text{M}$  è stato raggiunto dopo 180 minuti (Tmax), con un'emivita di 156 minuti (T1/2) e un'escrezione urinaria del 76% entro 12 ore <sup>[107]</sup>. Questo studio ha inoltre dimostrato che l'Indicaxantina entra nel flusso sanguigno in forma nativa, evidenziando la sua solubilità e la mancanza di modificazioni metaboliche da parte degli enterociti o degli epatociti. L'assenza di glucuronidazione, solfatazione o metilazione può essere vantaggiosa per una potenziale interazione con le membrane o con i recettori di membrana nei tessuti bersaglio. La cinetica di trasporto dell'Indicaxantina attraverso le cellule intestinali è stata studiata utilizzando cellule Caco-2 differenziate e inserti Transwell®. Fattori come la massa molecolare e le proprietà fisico-chimiche risultano cruciali per il trasporto paracellulare, con un elevato coefficiente di permeabilità a pH 6,0. Questo processo è dipendente dalla concentrazione e non coinvolge trasportatori protonici o di efflusso <sup>[108]</sup>. Studi differenti hanno rilevato variazioni nei coefficienti di permeabilità a diversi pH <sup>[109]</sup>. L'elevata resistenza dell'Indicaxantina alla digestione e la sua efficiente diffusione nell'epitelio intestinale spiegano la sua notevole biodisponibilità dai frutti di *Opuntia ficus-indica* <sup>[107]</sup>.

## **2. OBIETTIVO DELLA RICERCA**

### **2.1 Studio comparativo di citotossicità di estratti di fumo di sigaretta e di dispositivi di fumo alternativo**

Nonostante sia ampiamente riconosciuto che l'esposizione al fumo di tabacco rappresenti un fattore di rischio significativo per l'insorgenza di patologie cardiovascolari, quali infarto miocardico e ictus, la riduzione del consumo globale di tabacco è stata limitata, diminuendo solo meno del 5% in circa vent'anni. I dispositivi di nuova generazione (NGP), come le sigarette elettroniche (e-Cig) e i prodotti a tabacco riscaldato (THP), sono stati introdotti sul mercato globale con l'intento di favorire la cessazione o la riduzione del danno derivante dal consumo di tabacco. Tuttavia, le conseguenze del loro uso sulla salute umana non sono ancora del tutto comprese. L'obiettivo di questa ricerca è stato quello di esaminare i potenziali effetti citotossici sugli eritrociti umani del vapore/aerosol emesso dalle NGP, approfondendo i meccanismi di segnalazione alla base delle alterazioni funzionali di queste cellule. Il confronto degli effetti dell'esposizione degli eritrociti umani al vapore di sigaretta elettronica (eCSE) e all'aerosol del tabacco riscaldato (THPE) è stato effettuato in relazione al fumo di sigaretta convenzionale (CSE), di cui abbiamo già precedentemente messo in luce il meccanismo pro-eriptotico. Abbiamo monitorato la vitalità, la morfologia cellulare e i marcatori distintivi dell'eriptosi. Considerando la connessione ben documentata tra eriptosi, danno vascolare e occlusione trombotica nei capillari, lo studio potrebbe fornire informazioni rilevanti sul potenziale impatto delle e-Cig e dei prodotti THP sul sistema cardiovascolare. I risultati ottenuti potrebbero contribuire alla definizione di politiche di prevenzione delle malattie associate all'uso di prodotti a rischio ridotto.

## **2.2 Studio del meccanismo di protezione dell'indicaxantina da *Opuntia ficus indica* su eriptosi estrinseca indotta da CSE**

In un precedente studio abbiamo approfondito il meccanismo molecolare dell'azione eriptotica del CSE, dimostrando il ruolo centrale del DISC (*Death-Inducing Signaling Complex*) e il diretto coinvolgimento della caspasi iniziatrice 8 nel clivaggio ed attivazione della caspasi esecutrice 3 con successiva esternalizzazione della fosfatidilserina (PS). Il nostro lavoro dimostra il coinvolgimento della via estrinseca nel processo di morte programmata dei globuli rossi indotta da CSE e mostra per la prima volta il reclutamento e l'attivazione del DISC sia in assenza di ROS che di  $Ca^{2+}$ . Partendo da queste conoscenze ed essendo note le implicazioni patologiche dell'eriptosi in soggetti fumatori, un altro obiettivo del mio progetto di dottorato è stato quello di individuare dei fitochimici che possano inibire tale processo, mettendone in luce il meccanismo di inibizione con il fine di formulare un integratore alimentare che possa contrastare positivamente le patologie correlate ai globuli rossi eriptotici circolanti.

Considerando l'attività biologica dell'IND sugli eritrociti e il suo potenziale ruolo nel modulare l'eriptosi indotta dal CSE, in questo studio abbiamo valutato se e in che modo IND possa interferire con il pathway di morte programmata, attenuando gli effetti tossici del fumo. Gli eritrociti sono stati esposti al CSE in presenza di IND a concentrazioni comprese tra 1 e 5  $\mu$ M, trattandoli per 3 ore, tenendo conto del tempo necessario affinché IND raggiunga tali concentrazioni plasmatiche dopo l'assunzione di una dose nutrizionalmente rilevante di fichi d'India. Le concentrazioni di CSE sono analoghe a quelle utilizzate nello studio precedente, ovvero CSE al 10% e 20%.

### **3. MATERIALI E METODI**

#### **3.1 Preparazione di CSE, THPE ed e-Cig**

Tre sigarette Philip Morris Marlboro rosse (0.8 mg di nicotina/sigaretta), sei HEETS Philip Morris Marlboro heatsticks Sienna (contenenti 0.4 mg di nicotina per cartuccia) o 2 ml di liquido e-Cig (contenente 2.5 mg di nicotina), sono state aspirate per intero all'interno di una beuta codata collegata ad una pompa da vuoto. Il fumo/aerosol è stato fatto gorgogliare in 30 ml di una soluzione RINGER preriscaldata a 37°C. La soluzione contenete l'estratto del fumo di sigaretta (CSE), IQOS (THPE) ed e-Cig (eCSE), sono state successivamente sterilizzata tramite l'utilizzo di filtri con pori da 0.22 µm. Queste soluzioni rappresentano CSE, THPE ed eCSE al 100%. Le soluzioni sono state quindi opportunamente diluite per realizzare le concentrazioni di trattamento. La concentrazione di nicotina, uno dei componenti stabili degli estratti, è stata valutata mediante analisi LC-MS/MS effettuata utilizzando un sistema UHPLC Ultimate 3000 accoppiato a uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo TSQ Quantiva (Thermo Fisher Scientific, San José, CA, USA).

#### **3.2 RBC e condizioni di trattamento**

Campioni di sangue fresco sono stati raccolti da otto donatori maschi sani non fumatori, con un'età compresa tra 20 e 66 anni e un BMI normopeso tra 18.5 e 24.9. Questa raccolta è avvenuta previo consenso informato e i campioni di sangue sono stati prelevati in provette contenenti anticoagulante. Successivamente, i campioni di sangue sono stati sottoposti a centrifugazione utilizzando un gradiente di densità con Ficoll (Sigma-Aldrich, Cat. No. F5415) per 10 minuti, con una velocità di 1000 RPM, alla temperatura di 4°C. Dopo aver rimosso il plasma e il buffy coat, la rimanente componente eritrocitaria è stata lavata per due volte con soluzione Ringer contenente (mM) 125 NaCl, 5 KCl, 1 MgSO<sub>4</sub>, 32 N-2-idrossietilpiperazina-N-2-

etan-solfonico acido (HEPES)/NaOH, 5 glucosio, 1 CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4. Aliquote del pellet di RBC sono state diluite allo 0.4% di ematocrito nel solo Ringer o Ringer contenente CSE, THPE o eCSE alle diverse concentrazioni di trattamento. Gli eritrociti sono stati incubati in multiwell da 24 a 37°C, in presenza del 5% di CO<sub>2</sub> e del 95% di umidità per il tempo di trattamento stabilito. Le cellule isolate sono state pre-incubate per 1 h con indicaxantina 1-5 µM prima di aggiungere il 10% o il 20% di CSE. Il trattamento è stato protratto per ulteriori tre ore per imitare l'intervallo di tempo durante il quale, negli esseri umani, il pigmento ingerito con l'assunzione di frutti di fico d'india raggiunge la sua massima concentrazione plasmatica e incorporazione negli eritrociti circolanti. Dove espressamente indicato, i pre-trattamenti sono stati eseguiti con l'inibitore della nSMase GW4869 (Sigma-Aldrich, Cat. No. D1692) (15 µM), con l'inibitore della caspasi-8 Z-IETD-FML (MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, USA, Cat. No. HY-101297) (25 µM) o con l'inibitore della p38 MAPK SB203580 (MedChemExpress, Cat. No. HY-10256) (10 µM). Gli inibitori sono stati solubilizzati in una soluzione di dimetilsolfossido (DMSO) e usati a una concentrazione finale v/v di massimo lo 0.05% per garantirne la massima tollerabilità da parte delle cellule. Per selezionati esperimenti la soluzione Ringer è stata preparata in assenza di CaCl<sub>2</sub> e con 1,2-bis-(o-aminophenoxy)-ethane-N,N,N',N'-tetracetic acid, tetracetoxymethyl ester (BAPTA-AM) (50 µM). Gli eritrociti sono stati eventualmente pre-incubati per 1 h con inibitori specifici di PKC (Staurosporina, 1 µM) o cicloossigenasi (Acido acetilsalicilico, 50µM), prima del trattamento con gli estratti. Il protocollo di studio sperimentale è stato approvato dal Comitato di Bioetica dell'Università degli Studi di Palermo (n. 163/2023 del 26 ottobre 2023) e condotto in conformità con la Dichiarazione di Helsinki e i suoi emendamenti.

### **3.3 Estrazione e Purificazione dell'Indicaxantina**

L'Indicaxantina è stata estratta dai frutti dell'*Opuntia ficus-indica* (cultivar gialla, San Cono, Sicilia, Italia) come specificato nel brevetto n. 102021000015167 depositato il 10.06.2021. Brevemente, i frutti sono stati sbucciati e tritati finemente, la polpa è stata separata dai semi e pesata, e campioni di polpa di 100 g sono stati omogeneizzati e centrifugati a 3000 g per 10 min. Il surnatante è stato, poi, recuperato mentre il pellet veniva estratto con 100 ml di acqua distillata e centrifugato come sopra riportato. I soprannatanti sono stati sottoposti a crioesiccazione e il fitochimico, nell'estratto acquoso risultante, è stato separato mediante cromatografia a esclusione dimensionale in Sephadex G-25. Le frazioni contenenti il pigmento sono state sottoposte a crioesiccazione, seguita da estrazione in fase di solida (SPE) su colonne J.T. Baker, Bakerbond SPE C18 (VWR, Milano, Italia). L'eluato è stato sottoposto ad evaporazione rotativa per rimuovere il metanolo e il residuo disciolto in soluzione salina tamponata con fosfato (PBS). La concentrazione di indicaxantina è stata valutata mediante rivelazione spettrofotometrica a 482 nm con un coefficiente di estinzione di  $48 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Tutti i campioni sono stati porzionati e conservati a  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  fino all'uso successivo.

### **3.4 Analisi citofluorimetrica**

#### **3.4.1 Misura di esternalizzazione di PS**

L'esternalizzazione della fosfatidilserina è stata valutata utilizzando l'AnnessinaV-FITC, una proteina con un'elevata affinità per la PS che può essere coniugata con diversi fluorofori (in questo caso la fluoresceina isotiocianato) che conferiscono fluorescenza alla cellula apoptotica. L'intensità di fluorescenza rappresenta in maniera diretta la quantità di cellule apoptotiche. Dopo 24 h dal trattamento, gli eritrociti sono stati lavati con la soluzione Ringer e portati alla concentrazione di  $1 \times 10^6$  cellule/ml con una soluzione tampone secondo quanto riportato dal

protocollo del produttore (kit di rilevamento Apoptosi Annexine V FITC eBioscience Inc., San Diego, CA, USA). La sospensione cellulare (100 µl) è stata quindi trasferita in un tubo ed incubata con 5 µl Annessina V-FITC a temperature ambiente per 15 min al buio. Campioni di almeno  $1 \times 10^4$  cellule sono state sottoposte ad analisi mediante citometria a flusso con il citofluorimetro CytoFLEX System B2-R2-V0 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), ed elaborati usando il tool online Floreada.io. La fluorescenza associata alla Annessina V-fluoresceina isotiocianato (FITC) è stata misurata sul canale di fluorescenza FL-1 (lunghezza d'onda di eccitazione di 488 nm e di emissione di 530 nm).

### **3.4.2 Misura di ceramide**

La determinazione del ceramide è stata effettuata utilizzando l'anticorpo primario monoclonale anti-ceramide (clone MID 15B4, Alexis, Grünberg, Germany). Dopo 24 h dal trattamento, le cellule sono state incubate per 1 h a 37 °C con 1 µg di anticorpo anti-ceramide in PBS contenente lo 0.1% di albumina di siero bovino (BSA) a una diluzione 1:10. Successivamente i campioni sono stati lavati due volte con PBS-BSA e poi le cellule sono state incubate per 30 min con un anticorpo secondario goat anti-mouse IgG e IgM specifico, coniugato con fluoresceina isotiocianato (Pharmingen, Hamburg, Germany), diluito 1:50 in PBS-BSA. Eventuale anticorpo secondario non legato è stato rimosso con lavaggi ripetuti di PBS-BSA. I campioni sono quindi stati analizzati al citofluorimetro. Sono state analizzate almeno  $1 \times 10^4$  cellule per ciascun campione.

### **3.4.3 Misura di ROS intracellulari**

La produzione di ROS è stata determinata misurando le variazioni percentuali in Fluorescenza risultante dall'ossidazione del dicloro-diidro-fluoresceina diacetato (DCFDA) (Sigma- Aldrich, Cat. No. D6883) sonda fluorescente. DCFDA, alla concentrazione finale di 10 mM, è stato aggiunto a  $1 \times 10^5$  cellule 30 min prima della

fine del trattamento, al buio. I globuli rossi sono stati raccolti da centrifugazione (2000 g, 4 °C, 5 min), lavata, risospesa in soluzione salina tamponata con fosfato (PBS), e analizzata come riportato da Restivo et al. <sup>185</sup>.

#### **3.4.4 Misura di Ca<sup>2+</sup> intracellulare**

La concentrazione citosolica di Ca<sup>2+</sup> è stata monitorata misurando il cambiamento di fluorescenza Fluo-3 AM (Sigma-Aldrich, Cat. N. 73881) colorante usato come sonda per Ca<sup>2+</sup>, la cui intensità è direttamente rappresentativa dei livelli citosolici dello ione. Fluo-3 AM alla concentrazione finale di 2 µM, è stata aggiunta a 1 × 10<sup>5</sup> di eritrociti 40 min prima della fine del trattamento al buio. Dopo centrifugazione, (2000 g, 4 °C, 5 min) i globuli rossi sono stati lavati, risospesi in PBS e analizzati come riportato sopra.

#### **3.4.5 Misura dell'attività della APL-translocasi (APLT)**

L'attività APLT è stata misurata in citometria a flusso mediante la traslocazione di fosfolipidi marcati dal foglietto esterno a quello interno della membrana, come descritto da Tesoriere et al <sup>116</sup>. Brevemente, le sospensioni di RBC (2 × 10<sup>7</sup> cellule) sono state incubate a 37°C con 0.5 mM di sonda fluorescente NBD-PS, aggiunta da una soluzione madre di 1 mmol/L in tampone HEPES. Dopo 60 min, 5 µl del campione sono stati aggiunti a 250 µl di tampone HEPES contenente 0.1 mM EGTA e 1% di bovina serum albumin, che estrae solo la sonda NBD-PS associata alla superficie. L'analisi citofluorimetrica della fluorescenza residua del campione rivela la quantità di NBD-PS localizzata nel foglietto interno della membrana plasmatica a seguito dell'attività di APLT. Per ogni campione sono stati acquisiti almeno 10<sup>4</sup> eventi.

#### **3.4.6 Misura di integrità della proteina Banda 3**

L'integrità della Banda 3 è stata valutata citofluorimetricamente misurando la fluorescenza associata alla sonda eosin-5-maleimide (5-EMA, 63184, Merck). La

perdita dell'intensità di fluorescenza è direttamente rappresentativa della mancata integrità della Banda 3 che non riesce più a legare correttamente la sonda. A tale scopo gli RBC ( $2 \times 10^6$ ) sono stati trattati per 60 min ( $25^\circ\text{C}$  al buio) con 25 ml di 5-EMA (0.02 mg/ml). L'eccesso di sonda è quindi stato lavato per due volte con 0.5 ml di una soluzione BSA-PBS allo 0.5%. Gli RBC sono infine stati risospesi in 600 ml di BSA-PBS allo 0.5% e analizzati come riportati sopra.

### **3.5 Immunoprecipitazione**

Gli eritrociti ( $2 \times 10^8$  cellule), dopo il trattamento sono stati lavati per due volte con PBS, risospesi in lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 100 mM NaCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1% NP-40, 2 mM PMSF, 0.5 mM DTT and 2 mg/ml lysozyme) contenente inibitori di fosfatasi (Roche, Basel, Switzerland, Cat, No. 4906845001) ed inibitori delle proteasi (Roche, Cat. No. 4693132001) e sonicati (3 cicli, ciascuno da 30 sec) con Labsonic LBS1-10 (Labsonic Falc, Treviglio, Italy). I lisati cellulari sono stati centrifugati a 40.000 g per un'ora a  $4^\circ\text{C}$ . Aliquote di surnatanti contenenti  $500\mu\text{g}$  di proteine sono stati immunoprecipitati overnight con un anticorpo mouse anti-Fas (1:200) o anti-Band 3 (sc-133190, SCBT) a  $4^\circ\text{C}$  in agitazione. Al termine dell'incubazione sono stati aggiunti  $20\mu\text{l}$  di proteine G PLUS-Agarosio (beads) (Santa Cruz, Biotechnology, Dallas, TX, USA, sc-2002) per 3 h a  $4^\circ\text{C}$ . Le beads sono state pellettate, lavate due volte in lysis buffer e infine le proteine sono state separate mediante SDS-PAGE e immunoriconosciute attraverso western blot.

### **3.6 Analisi Western Blot**

La soluzione proteica di eritrociti ( $2 \times 10^8$  cellule) ottenuta come sopra è stata quantificata con il metodo Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, USA, n. cat. 5000006). Quantità uguali di proteine ( $50\mu\text{g}/\text{lane}$ ) per ciascun campione sono state separate mediante SDS-PAGE discontinua al 10% ed elettrotrasferite su una membrana di polivinilidene difluoruro (PVDF) (Millipore, n. cat. IPVH00010). I

blot sono stati trattati con una soluzione bloccante (5% di latte scremato) e quindi incubati per una notte a 4 °C con anticorpi primari in soluzione salina tamponata con Tris (TBS; 25 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4) contenente Tween 20 (1%, v/v) (TBST) e 5% (w/v) BSA. Sono stati utilizzati gli anticorpi monoclonali mouse anti-FADD (sc-271748), anti-Fas (sc-74540), anti-FasL (sc-33716), anti-caspasi-8 (sc-81657), p-p38 (sc-166182), p38 (sc-7972), p-Band 3 (BS-12569R, Bioss Inc, Woburn, MA, USA), ankyrin (sc-12733) spectrin (BS-10190R, Bioss Inc, Woburn, MA, USA) e adducin (A1592, ABclonal, Düsseldorf, Germany) a una diluizione di 1:200 acquistati da Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, USA), dove non specificato. Dopo tre lavaggi con TBST, le membrane sono state incubate con una diluizione 1:2000 dell'anticorpo secondario goat anti-mouse IgG, coniugato con perossidasi di rafano (HRP) (Sigma-Aldrich, n. cat. AP160P) per 1 h a temperatura ambiente. Gli immunoblots sono stati poi lavati sei volte con TBST e rilevati mediante chemiluminescenza (Amersham, Milano, Italia, n. cat. RPN2232). L'analisi densitometrica degli spot proteici è stata misurata con il software Quantity One Imaging (Bio-Rad, n. cat. 1708265) e i risultati sono stati riportati come unità densitometriche arbitrarie normalizzate rispetto a  $\beta$ -actina (sc-8432), Fas (sc-8009), Band-3 (sc-133190) e p38 (sc-7972).

### **3.7 Immunofluorescenza e Analisi Microscopica**

#### **3.7.1 Co-localizzazione FAS e Caspasi-8**

Per l'immunofluorescenza, eritrociti trattati e non trattati sono stati fissati in metanolo per 30 min su vetrini. Le cellule sono state incubate nella soluzione di smascheramento dell'antigene (10 mM tri-sodio citrato, 0,05% Tween-20) per 8 min a temperatura ambiente e trattati con una soluzione di blocco (3% BSA in PBS) per 30 min. In seguito, gli anticorpi primari anti-Fas ed anti-Caspasi 8 sono stati applicati e i vetrini sono stati incubati in una camera umidificata per una notte a 4

°C. Il giorno dopo, le cellule sono state incubate con anticorpi secondari fluorescenti specifici (anticorpo anti-rabbit IgG-Atto 647 prodotto in goat, 40839, Sigma-Aldrich, diluizione 1:150; anticorpo anti-mouse IgG-Atto 488 prodotto in goat, 62197, Sigma-Aldrich, diluizione 1:150). Le immagini sono state acquisite utilizzando un microscopio confocale Leica TCS SP8 (Leica Microsystems).

### **3.7.2 Integrità Banda 3**

Gli RBC ( $1 \times 10^6$  cellule) sono stati fissati fatti aderire per 60 min su  $\mu$ -dish 35 mm, high Glass Bottom, 81158, #1.5H, ibidi GmbH, Gräfelfing, Germania), precedentemente pre-trattati per 1 h con 1.5 ml di Poli-L-Lisina (Merck) 100  $\mu$ g/ml.  $\mu$ -dish sono quindi stati lavati per due volte con PBS e successivamente fissati per 20 min a 25 °C con paraformaldeide (Merck) al 3.7%. Dopo 2 lavaggi con PBS gli RBC sono stati incubati per 1 h al buio con la sonda a fluorescenza 5- EMA (0.03 mg/ml).  $\mu$ -dish sono quindi stati lavati e coperti con gocce di PBS. Le immagini sono state catturate con una camera Digital Sight 10 (Nikon Europe B.V., Stroombaan, Paesi Bassi) da 23.9 megapixel, utilizzando un obiettivo 100x ad immersione in olio montato su un microscopio a fluorescenza Nikon Ts2R.

### **3.8 Attività caspasi 3**

La misurazione dell'attività della Caspasi 3 è stata effettuata secondo il protocollo Millipore (APT165 – Caspase-3 Colorimetric Activity Assay Kit). Dopo i trattamenti,  $2 \times 10^6$  RBCs sono stati prelevati dai pozzetti, centrifugati ed il precipitato è stato omogenizzato in 200  $\mu$ l di Cell Lysis Buffer 1X freddo. I campioni omogenizzati sono stati sottoposti a tre cicli di congelamento e scongelamento per assicurare la totale lisi cellulare. I campioni sono quindi stati centrifugati in microcentrifuga per 2 min a 13.000 g. Il surnatante è stato posto in microtubi puliti e posti in ghiaccio, pronti per la preparazione del MIX di reazione. Nel Mix di reazione abbiamo posto 50  $\mu$ l di campione, 20  $\mu$ l di H<sub>2</sub>O, 20  $\mu$ l di Assay

Buffer 5X e 10 µl di Substrato Caspasi 3 (Ac-DEVD-pNA) per un totale di 100 µl. Il Mix è stato quindi posto in piastre da 96 pozzetti e lasciato ad incubare al buio a 37° per 60-120 min. Dopo l'incubazione la piastra è stata letta in colorimetria a 405 nm. L'attività di Caspasi 3 è stata determinata tramite interpolazione con la curva di calibrazione dello standard Ac-DEVD-pNA colorato di giallo.

### **3.9 Determinazione di ATP**

La misura dei livelli di ATP è stata effettuata secondo il protocollo Abcam (ab83355 – ATP Assay Kit). Dopo i trattamenti, gli eritrociti ( $1 \times 10^7$  cellule) sono stati prelevati dai pozzetti, centrifugati ed il precipitato è stato omogenizzato in 100 µl di ATP Assay Buffer. I campioni omogenizzati sono stati sottoposti a tre cicli di congelamento e scongelamento per assicurare la totale lisi cellulare. I campioni sono quindi stati centrifugati in microcentrifuga per 2 min a 13.000 g. Il surnatante è stato posto in microtubi puliti e posti in ghiaccio, pronti per la deproteinizzazione seguendo il kit Abcam (ab204708 - Deproteinizing Sample Preparation Kit – TCA). A seguito della deproteinizzazione i campioni sono pronti per seguire gli step successivi. Nel Mix di reazione abbiamo posto 50 µl di campione deproteinizzato, 45.8 µl di Assay Buffer, 2 µl di ATP Converter e 2 µl di Developer Mix. Il Mix è stato quindi posto in piastre da 96 pozzetti e lasciato ad incubare al buio a 37° per 30 min. Post-incubazione la piastra è stata letta in fluorescenza a 535 nm di eccitazione e 587 nm di emissione. La concentrazione di ATP dei campioni è stata determinata tramite interpolazione con la curva di calibrazione dello standard di ATP utilizzando la formula di calcolo  $(B/V * D) * DDF$ .

### **3.10 Emolisi**

Dopo il trattamento, i globuli rossi sono stati centrifugati (1800 giri/min, 24 °C, 5 min) e la concentrazione di Hb nel surnatante è stata misurata mediante assorbimento a 421 nm (Banda di Soret) mediante spettrofotometria

(Spettrofotometro DU-640 Beckman, Brea, CA, USA). Il valore di assorbanza a 421 nm del surnatante derivato da eritrociti simili lisati in acqua distillata è stato considerato come 100% emolisi.

### **3.11 Analisi statistica**

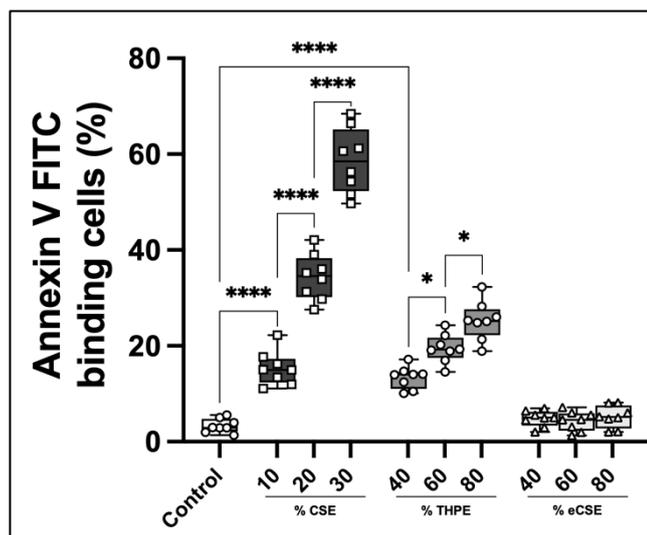
I risultati sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard (SD) di n. esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le comparazioni statistiche sono state eseguite con la versione 9 del software di Prisma GraphPad (Software Inc., San Diego, CA, USA), utilizzando il test della varianza unidirezionale (ANOVA) associato al test di Tukey. La differenza significativa dei valori è stata considerata per  $p < 0.05$ .

## 4. RISULTATI E DISCUSSIONI

### 4.1 Studio comparativo di citotossicità di estratti di fumo di sigaretta e di dispositivi di fumo alternativo

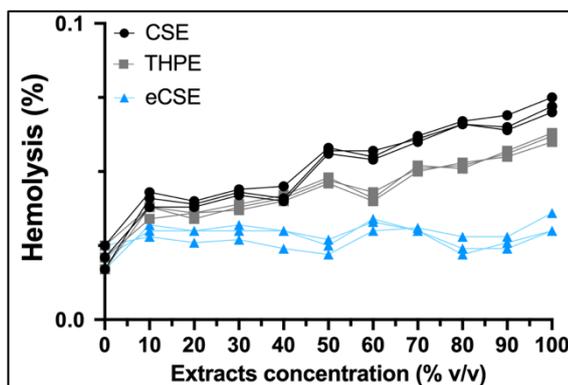
#### 4.1.1 THPE, ma non eCSE, promuove l'eritrosi in eritrociti umani isolati

È noto che CSE induce eritrosi, caratterizzata dall'esposizione di PS sul foglietto esterno della membrana cellulare, accompagnata da un aumento del livello intracellulare di ceramide attraverso un meccanismo indipendente dallo stress ossidativo e dalla variazione della concentrazione di  $Ca^{2+}$  [185]. Il trattamento degli eritrociti per 24 ore con concentrazioni crescenti di THPE (dal 40% all'80%) ha provocato un aumento dell'esternalizzazione di PS, valutata citofluorimetricamente mediante legame con annessina V-FITC, in modo dose-dipendente (Fig. 9). In confronto, l'attività eriptotica indotta da THPE all'80% risultava comparabile ( $p < 0,05$ ) a quella osservata con l'esposizione al 20% di CSE. Inoltre, l'aggiunta di eCSE al mezzo non ha indotto alcuna alterazione nella distribuzione di PS sulla membrana a nessuna delle concentrazioni testate.



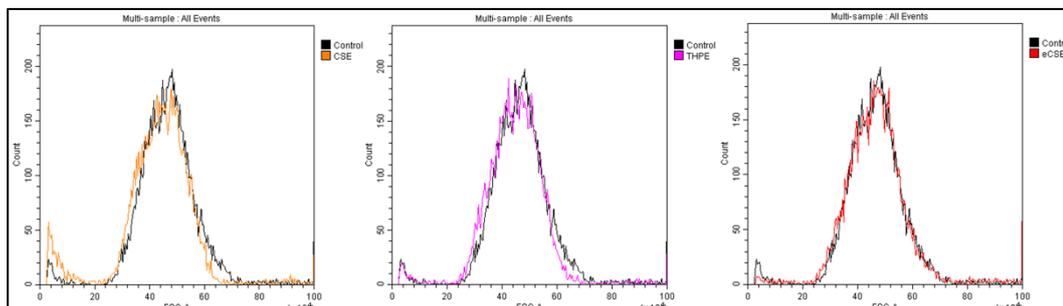
**Figura 9.** Analisi citofluorimetrica dell'esternalizzazione di PS con diverse concentrazioni di CSE, THPE ed eCSE. I valori sono la media  $\pm$  SD di sei esperimenti indipendenti condotti in triplicato. \* $p < 0,05$ , \*\*\*\* $p < 0,001$  (Anova one-way associato al test Tukey).

Inoltre, il trattamento degli RBCs per 24 ore con CSE, THPE o eCSE non ha provocato effetti emolitici significativamente rilevanti (Fig. 10).



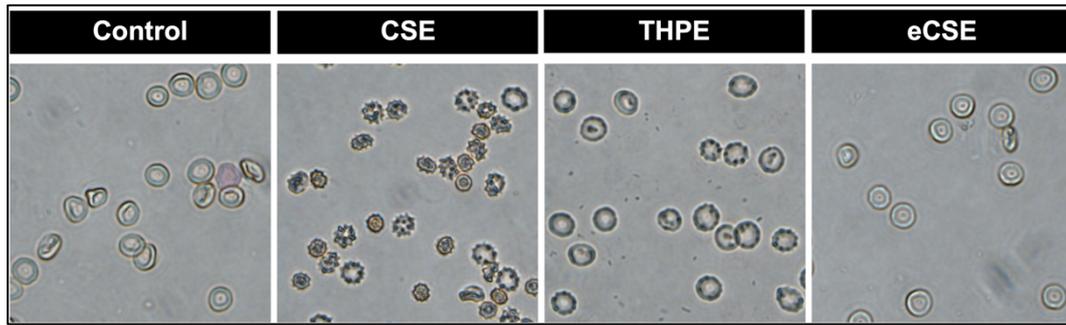
**Figura 10.** Percentuale di emolisi di RBC trattati con diverse concentrazioni di CSE, THPE ed eCSE. I valori sono la media di tre esperimenti indipendenti condotti in triplicato.

Questi risultati, escludendo un'azione citotossica di eCSE sugli eritrociti, hanno evidenziato un chiaro effetto eriptotico del THPE. Tale effetto, a parità di condizioni, si è rivelato meno pronunciato rispetto a quello del CSE. Inoltre, questo processo eriptotico indotto da CSE e THPE è caratterizzato dalla diminuzione del volume cellulare misurato in termini di variazione del Forward Scatter (Fig. 11).



**Figura 11.** Analisi citofluorimetrica del Forward Scatter in RBC trattati con CSE 20%, THPE 80% ed eCSE 80%.

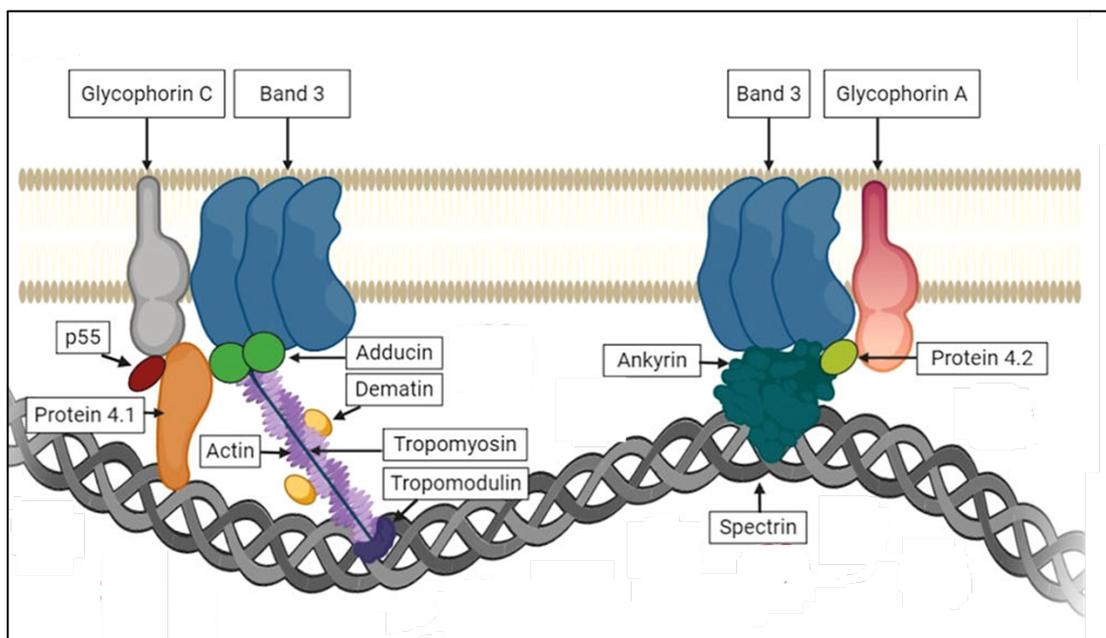
Gli RBCs trattati con THPE e CSE, osservati tramite utilizzo di microscopia ad alta risoluzione, mostravano un profondo cambiamento morfologico con formazione di spicole con un effetto del CSE 20% chiaramente maggiore rispetto a quello causato da THPE 80%. Tali estroflessioni della membrana rappresentano un tratto caratteristico di RBCs eriptotici (Fig. 12).



**Figura 12.** Analisi microscopica della morfologia di eritrociti trattati con CSE 20%, THPE 80% ed eCSE 80%.

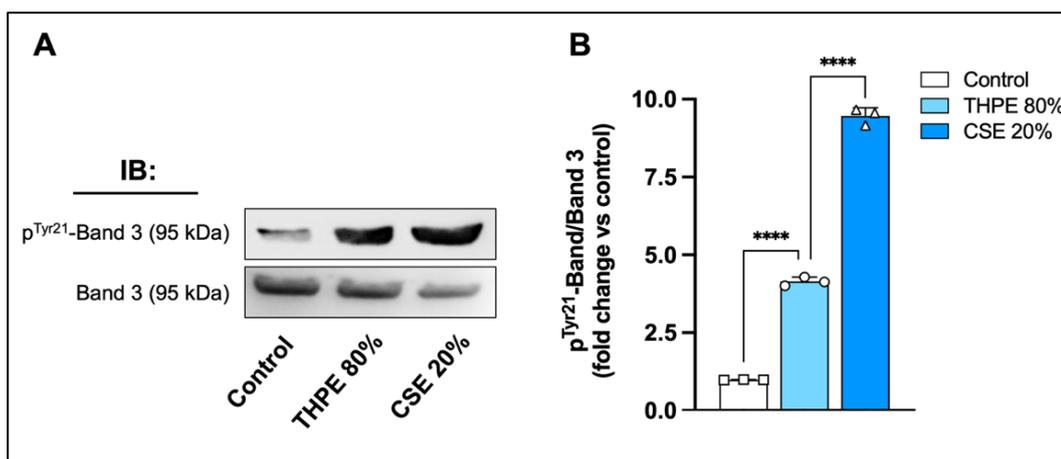
#### 4.1.2 Modifiche indotte da CSE e THPE della struttura proteica della membrana eritrocitaria

Data la stretta correlazione tra le variazioni morfologiche e l'interazione tra proteine di membrana e citoscheletriche, ci siamo concentrati sullo studio della banda 3. Banda 3 è una abbondante proteina della membrana degli eritrociti coinvolta, insieme ad altre proprietà, nel legame delle proteine del citoscheletro alla membrana della cellula. Infatti, l'eterodimero  $\alpha$  e  $\beta$  spectrina è ancorato ai lipidi di membrana da complessi proteici costituiti da: Banda 3 ed anchirina; Banda 3, adducina ed actina ed infine da glicoforina e proteina 4.1 e 4.2. (Fig. 13)



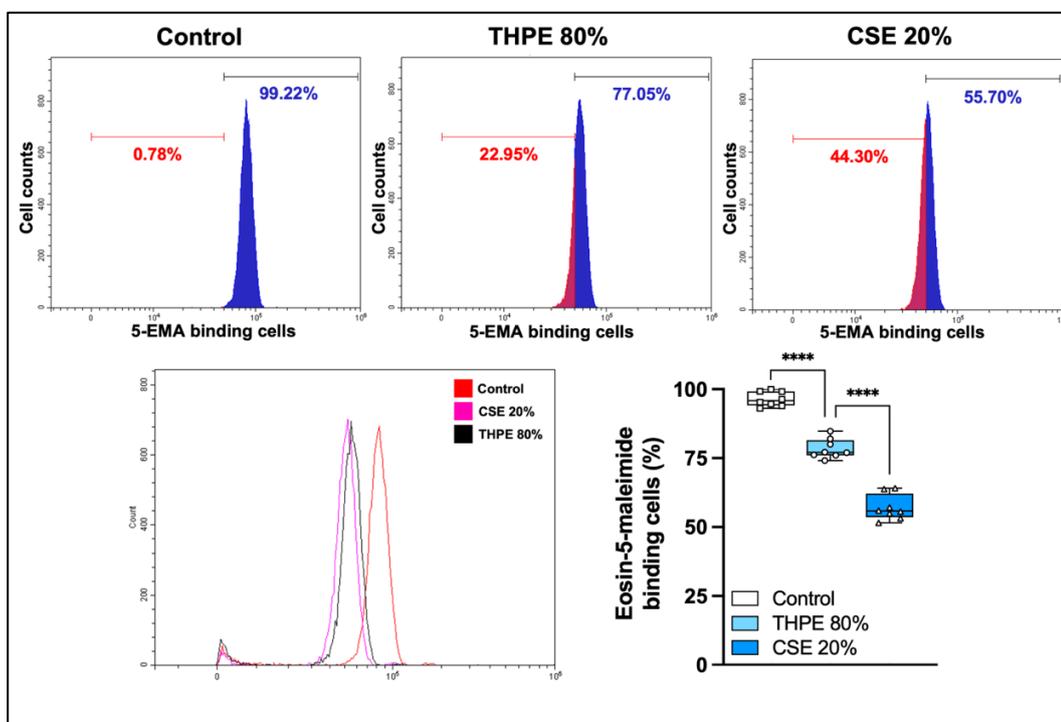
**Figura 13.** Interazione delle proteine di membrana dell'eritrocita con quelle del citoscheletro.

La fosforilazione di Banda 3 in residui di tirosina (Y8, Y21, Y359 e Y904), indebolisce il legame con le proteine con cui interagisce e promuove il proprio rilascio dalla membrana. Ciò favorisce la dissociazione del network con la spettrina, causando una struttura citoscheletrica più flessibile accompagnata da una ridotta stabilità della membrana [118,119]. In condizioni fisiologiche, il continuo processo di fosforilazione/defosforilazione delle proteine come Banda 3 e 4.1 regola la deformabilità del globulo rosso e mantiene le proprietà reologiche della microcircolazione. Al contrario, l'iperfosforilazione delle stesse è associata a modifiche della forma cellulare, instabilità della membrana e formazione di microvescicole. Alla luce di ciò, abbiamo voluto studiare l'influenza di CSE e THPE sulla struttura proteica della membrana eritrocitaria valutando inizialmente il livello di fosforilazione di banda 3 mediante western blot. Come mostrato in Figura 14, il trattamento per 24h delle cellule con CSE 20% o con THPE 80% incrementa la quantità di proteina P rispetto alla forma non-P di quasi 10 volte e 4.5 volte, rispettivamente.



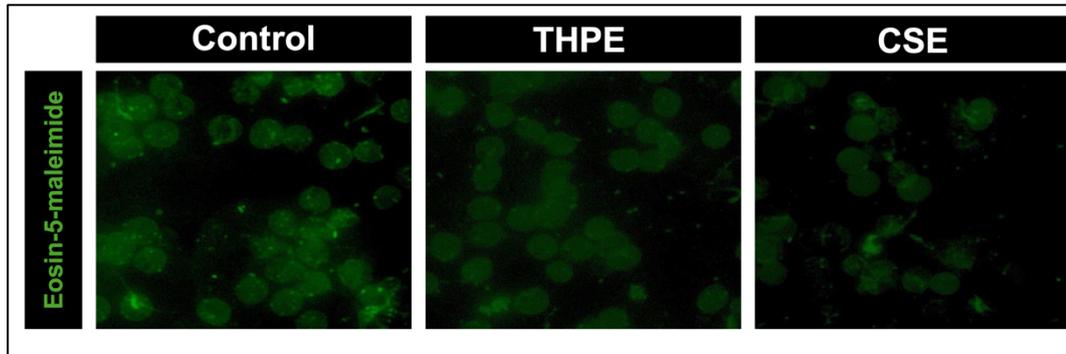
**Figura 14.** Livelli proteici di p-Band 3 in RBC trattati con THPE 80% e CSE 20%. (A) Immagine rappresentativa delle proteine analizzate. (B) Analisi densitometrica di p-Band 3; normalizzata per Band 3. I valori sono la media  $\pm$  SD della densitometria delle bande proteiche di tre esperimenti indipendenti con risultati comparabili. \*\*\*\*  $p < 0.001$  (Anova one-way associato al test Tukey).

Abbiamo quindi valutato se la modifica covalente della proteina fosse associata ad una modifica complessiva dell'architettura proteica di membrana attraverso l'uso della sonda eosin-5-maleimide (EMA), un colorante fluorescente che si lega ai gruppi  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> della Lys-430 della banda 3 di membrana [120]. La diminuzione di banda 3 in membrana provoca un decremento dell'intensità di fluorescenza del legame di EMA. Anche la riduzione di altre proteine citoscheletriche associate alla membrana, come banda 4.2 ed anchirina, spostano la fluorescenza verso più bassi valori, a causa dell'interazione di queste proteine con banda 3 [121]. Gli eritrociti sono stati quindi trattati per 24 h con CSE o THPE e, dopo marcatura con EMA, la fluorescenza delle cellule è stata misurata mediante citofluorimetria. Come mostrato in Figura 15, in confronto a RBC incubati nelle stesse condizioni in assenza di estratti del tabacco (controllo), il CSE 20% e il THPE 80% riducevano la fluorescenza del 40% e del 25%, rispettivamente.



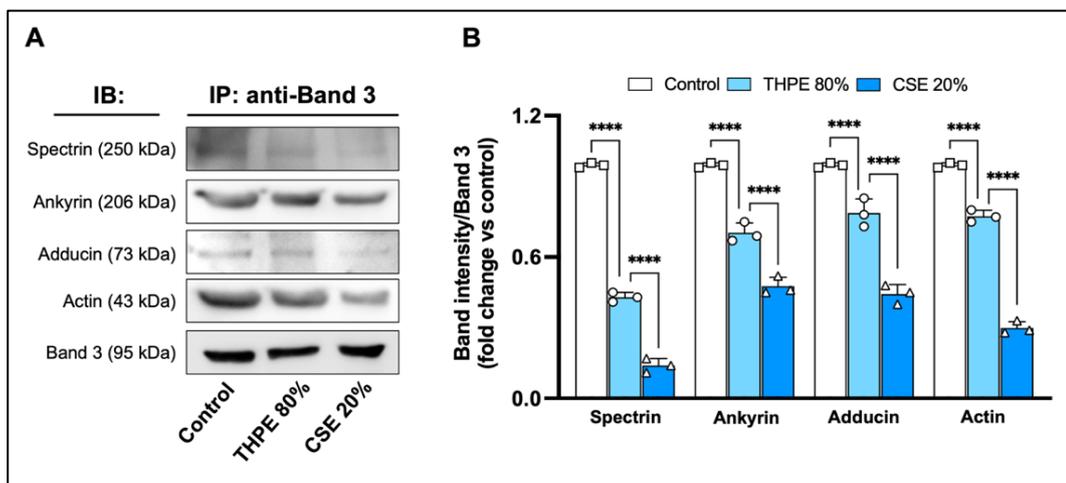
**Figura 15.** Analisi citofluorimetrica dell'integrità di Banda 3, attraverso l'uso della sonda eosin-5-maleimide (EMA), in RBC trattati con THPE 80% e CSE 20%. I valori sono la media  $\pm$  SD di sei esperimenti indipendenti condotti in triplicato. \*\*\*\*  $p < 0.001$  (Anova one-way associato al test Tukey).

La visualizzazione delle cellule mediante microscopia a fluorescenza confermava la riduzione dell'intensità di fluorescenza associata al legame di EMA a Banda 3 causata dal trattamento con gli estratti (Fig 16). Anche qui risulta evidente un effetto del CSE 20% maggiore rispetto a quello del THPE 80%.



**Figura 16.** Immagini rappresentative di immunofluorescenza dell'integrità di Banda 3, attraverso l'uso della sonda eosin-5-maleimide (EMA), in RBC trattati con THPE 80% e CSE 20%.

Per confermare la modifica delle interazioni tra le proteine del citoscheletro e banda 3 nella membrana eritrocitaria causata dal trattamento con gli estratti del fumo di tabacco, abbiamo ricercato mediante western blot la presenza di spettina, actina, anchirina, adducina in immunoprecipitati di membrana con Banda 3. La Figura 17 mostra che tutte le proteine ricercate sono associate alla Banda 3 in quantità minore rispetto al controllo quando gli eritrociti erano esposti a THPE 80% o CSE 20%.

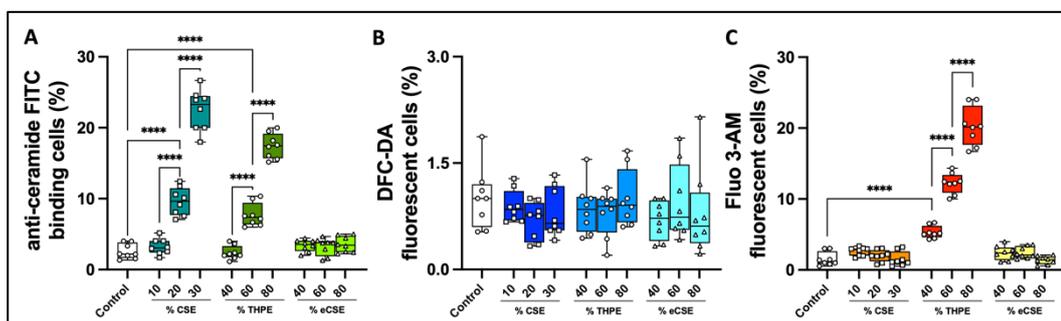


**Figura 17.** (A) Immagini rappresentative delle immunodetezioni di spettina, ankirina, actina e adducina dopo immunoprecipitazione con anticorpo anti-Banda 3 in RBC trattati con THPE 80% e CSE 20%. (B) Analisi densitometrica dei livelli di spettina, ankirina e adducina,

normalizzati per Banda 3. I valori sono le medie  $\pm$  SD della densitometria delle bande di tre esperimenti indipendenti con risultati comparabili. \*\*\*\*  $p < 0,001$  (ANOVA-one way associato a Tukey test).

### 4.1.3 Studio del meccanismo dell'attività eriptotica di THPE.

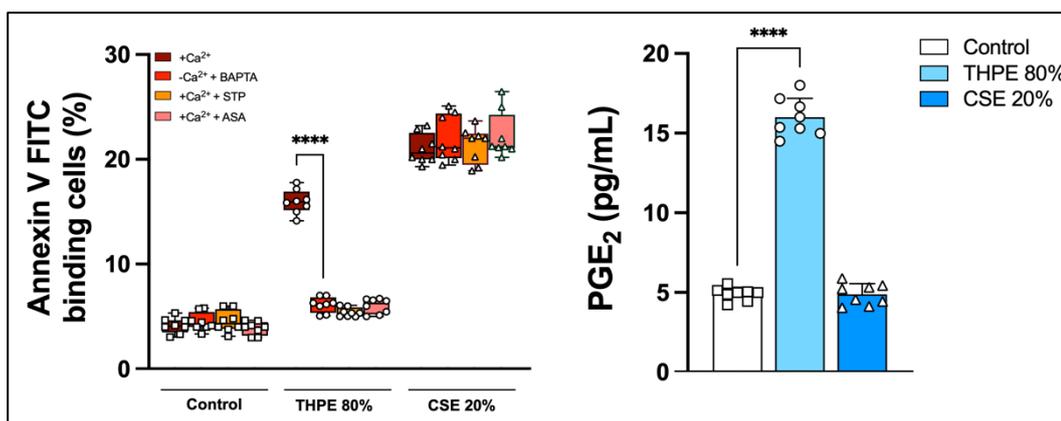
Avendo stabilito che il THPE ha un effetto pro-eriptotico, abbiamo cercato di indagare gli aspetti che condivide con il fumo di sigaretta tradizionale. Utilizzando l'analisi della citometria a flusso, abbiamo studiato i livelli intracellulari del lipide bioattivo ceramide, dei ROS e del calcio, tutti noti segni distintivi dell'eriptosi. Il THPE ha determinato un incremento del livello di ceramide, evidenziato da un aumento della fluorescenza cellulare misurata tramite FACS in presenza di anti-ceramide-FITC (Fig. 18A). Anche in questo caso, l'effetto del THPE all'80% non differiva significativamente ( $p < 0.05$ ) da quello indotto dal 20% di CSE. Analogamente a quanto osservato con CSE, l'esposizione degli eritrociti a THPE non ha prodotto, a nessuna delle concentrazioni analizzate, un aumento dei livelli di ROS, misurati citofluorimetricamente utilizzando la sonda DFC-DA (Fig. 18B). Tuttavia, a differenza di CSE, THPE ha stimolato l'ingresso di  $Ca^{2+}$  negli eritrociti, come indicato dall'aumento della fluorescenza rilevata con il fluoroforo Fluo 3-AM (Fig. 18C).



**Figura 18.** Analisi citofluorimetrica della produzione di ceramide (A), livelli di ROS intracellulari (B) e livelli di  $Ca^{2+}$  intracellulari (C) in RBC trattati con diverse concentrazioni di CSE, THPE ed eCSE. I valori sono la media  $\pm$  SD di sei esperimenti indipendenti condotti in triplicato. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*\*  $p < 0.001$  (Anova one-way associato al test Tukey).

Come descritto in precedenza, THPE induce un incremento dei livelli di  $Ca^{2+}$  negli eritrociti. In risposta a diversi stimoli, l'ingresso di  $Ca^{2+}$  negli eritrociti avviene

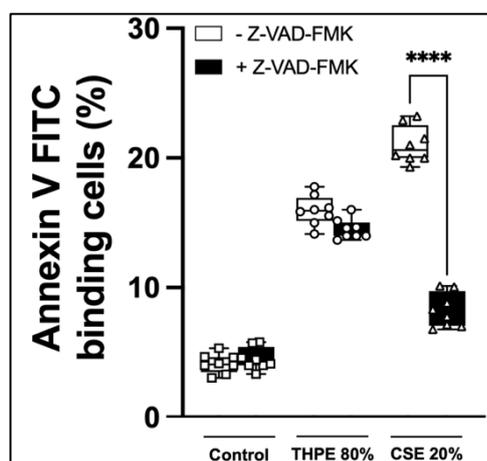
attraverso canali cationici non selettivi attivati da PGE<sub>2</sub> [110]. Per valutare il ruolo del Ca<sup>2+</sup> nel processo eriptotico indotto da THPE, abbiamo trattato gli eritrociti con THPE all'80% in soluzione di Ringer priva di Ca<sup>2+</sup> e in presenza del chelante EGTA, oppure dopo 1 h di pre-incubazione con ASA, un inibitore dell'enzima COX, responsabile del rilascio di PGE<sub>2</sub> nelle cellule. Come mostrato in Fig. 19A, entrambe le condizioni hanno prevenuto l'esposizione di PS, indicando che il Ca<sup>2+</sup> è necessario per l'attività eriptotica indotta da THPE e che il suo ingresso nelle cellule è mediato da canali dipendenti da PGE<sub>2</sub> (Fig. 19B). La proteina chinasi C, Ca<sup>2+</sup>-dipendente, svolge un ruolo cruciale nella modifica delle proteine del citoscheletro cellulare ed è coinvolta nei processi apoptotici. Quando gli eritrociti sono stati pre-trattati con staurosporina prima dell'aggiunta di THPE nel mezzo, l'esternalizzazione di PS è stata inibita (Fig. 19A), confermando il coinvolgimento dell'enzima nel meccanismo di morte cellulare indotto da THPE. In confronto, le stesse condizioni non hanno influenzato l'effetto apoptotico esercitato dal CSE sulle cellule (Fig. 19A).



**Figura 19.** Analisi citofluorimetrica dell'esternalizzazione di PS in RBC trattati con THPE 80% e CSE 20% in presenza o in assenza di Ca<sup>2+</sup>, chelante Ca<sup>2+</sup> selettivo (EGTA), inibitore PKC (STP) ed inibitore COX-2 (ASA). I valori sono la media  $\pm$  SD di sei esperimenti indipendenti condotti in triplicato. \*\*\*\*  $p < 0.001$  (Anova one-way associato al test Tukey).

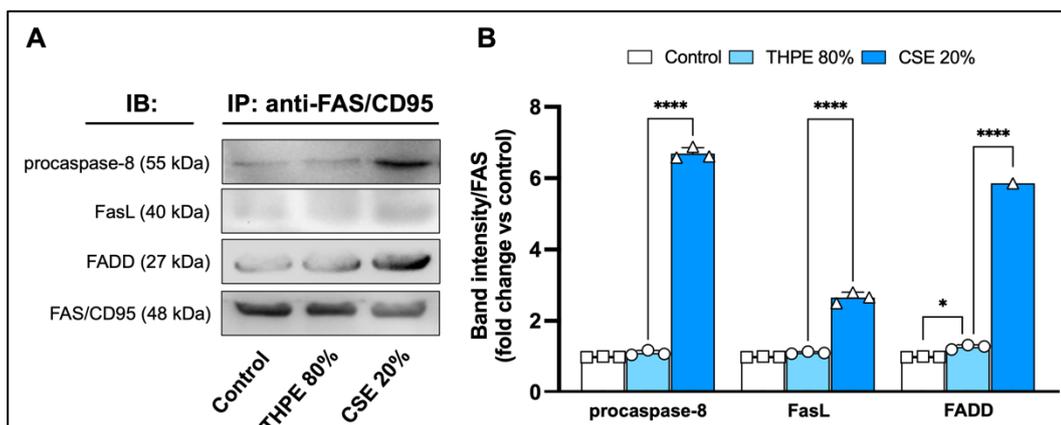
La caspasi 3 è una proteasi chiave che regola le modifiche del corredo proteico cellulare durante il processo di morte programmata ed è attivata negli eritrociti

dall'esposizione a CSE. Il pretrattamento degli eritrociti con Z-VAD-FMK, un inibitore specifico della caspasi 3, ha inibito, come previsto, l'esposizione di PS sulla membrana indotta dal trattamento con CSE, senza però influenzare l'effetto eriptotico di THPE (Fig. 20).



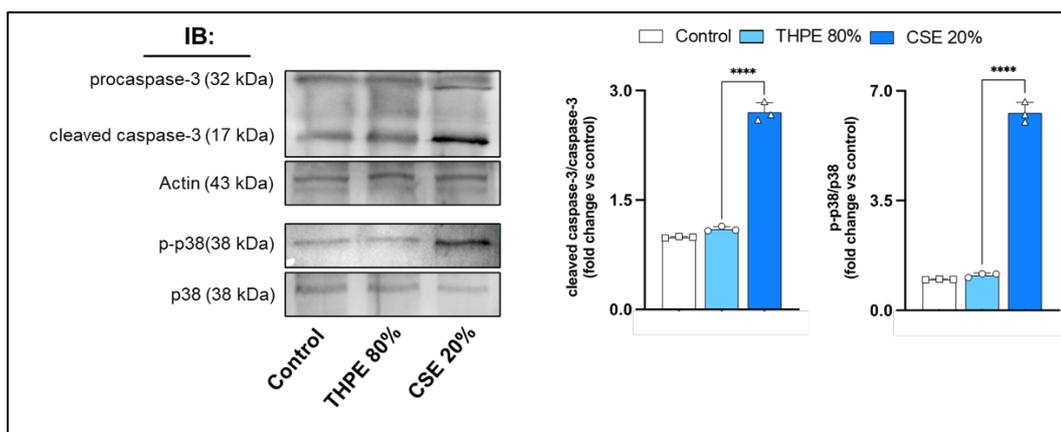
**Figura 20.** Analisi citofluorimetrica dell'esternalizzazione di PS in RBC trattati con THPE 80% e CSE 20% in presenza o in assenza di inibitore specifico della caspasi 3 Z-VAD-FMK. I valori sono la media  $\pm$  SD di sei esperimenti indipendenti condotti in triplicato. \*\*\*\*  $p < 0.001$  (Anova one-way associato al test Tukey).

È stato dimostrato che CSE stimola l'eriprosi attraverso una via di segnalazione estrinseca che coinvolge l'assemblaggio del complesso DISC sulla membrana, preceduto dall'attivazione della MAPK p38 e seguito dal clivaggio della caspasi 3. Abbiamo quindi indagato se il trattamento degli eritrociti con THPE inducesse il reclutamento in membrana di FasL, FADD e caspasi 8, i componenti proteici del DISC. A tale scopo, dopo 24 ore di incubazione con THPE all'80%, le cellule sono state lisate e incubate con un anticorpo anti-Fas. L'immunoprecipitato è stato poi sottoposto a SDS-PAGE e le proteine di interesse sono state analizzate mediante immunoblotting. Come mostrato in Fig. 21, l'esposizione degli eritrociti a THPE non ha causato la migrazione in membrana di FasL, FADD o caspasi 8, dimostrando che, a differenza di CSE, la tossicità di THPE non coinvolge l'assemblaggio del DISC.



**Figura 21.** Livelli proteici di procaspasi-8, FasL e FADD in RBC trattati con THPE 80% e CSE 20%. **(A)** Immagine rappresentativa delle proteine analizzate. **(B)** Analisi densitometrica di procaspasi-8, FasL e FADD; normalizzata per FAS/CD95. I valori sono la media  $\pm$  SD della densitometria delle bande proteiche di tre esperimenti indipendenti con risultati comparabili. \* $p < 0.05$ , \*\*\*\* $p < 0.001$  (Anova one-way associato al test Tukey).

Inoltre, trattamento delle cellule con THPE non era associato ad attivazione per fosforilazione della MAPK p38 né a clivaggio della caspasi esecutrice 3 (Fig. 22).

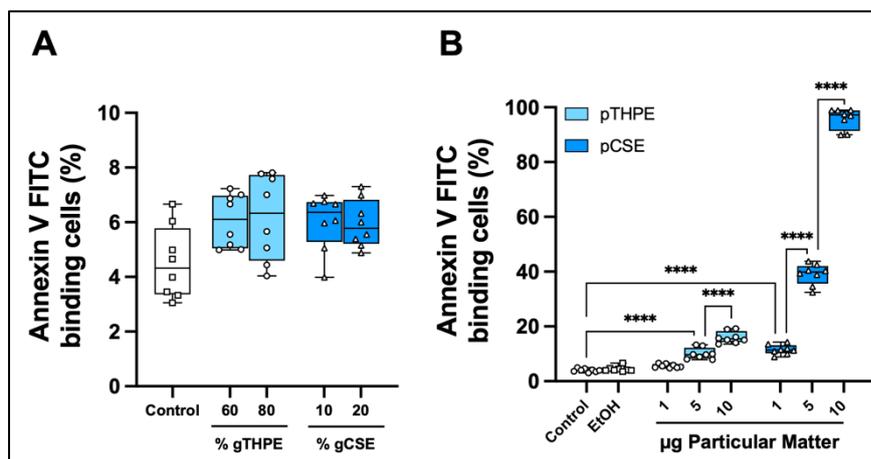


**Figura 22.** Clivaggio di caspasi-3 e fosforilazione di p38 MAPK in RBC trattati con THPE 80% e CSE 20%. **(A)** Immagine rappresentativa delle proteine analizzate. **(B)** Analisi densitometrica di caspasi-3 clivata/procaspasi-3 e p-p38; normalizzata per actina e p38. I valori sono la media  $\pm$  SD della densitometria delle bande proteiche di tre esperimenti indipendenti con risultati comparabili. \*\*\*\* $p < 0.001$  (Anova one-way associato al test Tukey).

Complessivamente, questi risultati dimostrano che i prodotti del fumo derivanti dai due diversi sistemi di estrazione del tabacco, ossia dalla combustione delle sigarette tradizionali e dalla tostatura nei dispositivi di fumo di nuova generazione come i THP, inducono la morte apoptotica degli eritrociti attraverso meccanismi di segnalazione ed esecuzione distinti.

#### **4.1.4 Ricerca della componente del fumo responsabile dell'effetto eriptotico di CSE e THPE**

Il fumo mainstream di sigaretta è composto da due frazioni distinte, separabili tramite l'uso di un filtro in fibra di vetro di Cambridge (0,1 micron): una frazione corpuscolata, che rimane adsorbita nel filtro e viene successivamente raccolta con solventi come etanolo o DMSO, e una frazione gassosa, che essendo idrofila si dissolve in una soluzione acquosa. La frazione corpuscolata dell'estratto contiene nicotina (56%), nicotrina (18,0%), glicerina (3,20%), cloroetano, fenolo e diverse specie ossidanti stabili come semichinoni in equilibrio con chinoni e idrochinoni <sup>[111]</sup>. Le fasi gassose del fumo/aerosol delle sigarette tradizionali e dei THP contengono invece sostanze tossiche quali acroleina, benzene, isoprene, piridina e pirrolo, oltre a numerosi radicali altamente instabili <sup>[112]</sup>. Per identificare quale frazione degli estratti sia il principale responsabile dell'effetto pro-eriptotico, abbiamo separato gli estratti nelle due fasi: la fase gassosa (gTHPE/gCSE) e la fase corpuscolata (pTHPE/pCSE). Il trattamento degli eritrociti con gTHPE al 60/80% e gCSE al 10/20% non ha mostrato alcun aumento significativo nell'esternalizzazione di PS (Fig. 23A). Al contrario, l'esposizione delle cellule a concentrazioni crescenti di pTHPE e pCSE ha indotto un'esposizione di PS ( $p < 0.05$ ), in maniera dose-dipendente (Fig. 23B).



**Figura 23.** Analisi citofluorimetrica dell'esternalizzazione di PS in RBC trattati con gTHPE/gCSE (A) e pTHPE/pCSE (B). I valori sono la media  $\pm$  SD di sei esperimenti indipendenti condotti in triplicato. \*\*\*\* $p < 0.001$  (Anova one-way associato al test Tukey).

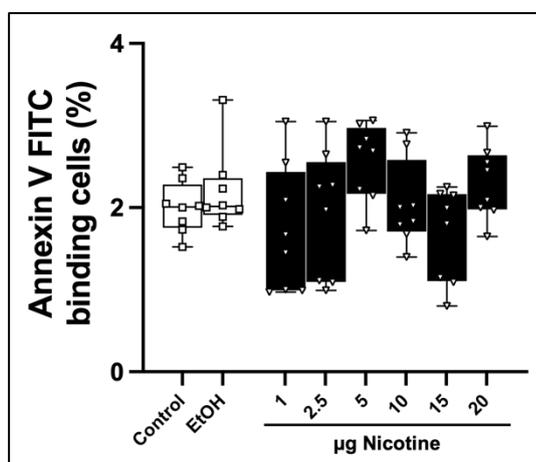
Poiché la nicotina è una delle principali sostanze presenti nella frazione corpuscolata, gli estratti del fumo di sigaretta tradizionale e dell'aerosol prodotto dal sistema THP sono stati analizzati mediante HPLC/MS per determinare il contenuto di nicotina. Come riportato nella Tabella 1, sebbene il contenuto iniziale dell'alcaloide nei due prodotti da fumo fosse identico (2,4 mg), la quantità di nicotina estratta risultava diversa. La combustione del tabacco ha mostrato una capacità estrattiva quasi doppia rispetto alla tostatura a 300°C del sistema THP.

Prodotto	Nicotina $\mu\text{g/mL}$
CSE	36.8 $\pm$ 2.5
THPE	19.3 $\pm$ 1.1

**Tabella 1.** Caratterizzazione del contenuto nicotinic in CSE e THPE.

Per determinare se la nicotina fosse la causa principale dell'effetto citotossico degli estratti, gli eritrociti sono stati incubati con nicotina pura a concentrazioni comprese tra 1 e 20  $\mu\text{g/mL}$ . Nonostante le concentrazioni più elevate di nicotina utilizzate superassero ampiamente quelle presenti negli estratti in tutte le condizioni di

trattamento precedenti, gli eritrociti non hanno mostrato alcun aumento nell'esternalizzazione di PS (Fig. 24).



**Figura 24.** Analisi citofluorimetrica dell'esternalizzazione di PS in RBC trattati con nicotina pura 1-20 µg/mL. valori sono la media ± SD di sei esperimenti indipendenti condotti in triplicato. \*\*\*\*p < 0.001 (Anova one-way associato al test Tukey).

Questo risultato, sebbene in contrasto con altri modelli cellulari in vitro in cui la nicotina ha mostrato effetti apoptotici in cellule umane gengivali, polmonari, cardiache, renali e ossee [113-117], ci porta a escludere la nicotina come causa dell'effetto pro-eriptotico degli estratti. Tale risultato può essere giustificato dal fatto che la maggior parte degli organelli cellulari sensibili al redox coinvolti nell'apoptosi, come mitocondri e nucleo, non sono presenti negli eritrociti. Inoltre, la fase corpuscolata del fumo/aerosol delle sigarette tradizionali e dei THP contiene 402 delle 529 sostanze chimiche caratterizzate tramite spettrometria di massa, senza contare metalli, semi-metalli, sostanze radioattive e molecole non ionizzabili [112]. Dal nostro punto di vista, è evidente che uno o più composti generati in diversa qualità e quantità dalle differenti temperature di combustione e tostatura del tabacco siano responsabili dell'effetto pro-eriptotico di THPE e CSE. Pertanto, futuri studi si prefiggeranno di identificare quali di queste sostanze siano implicate nei processi eriptotici.

In conclusione, questi risultati dimostrano chiaramente che estratti di fumo modificano criticamente la struttura delle proteine del citoscheletro associate alla membrana, determinando fosforilazione di Banda 3, riduzione della proteina in membrana e, di conseguenza, perdita dell'integrità del network proteico ad essa associata. La modifica della struttura di membrana è confermata dalla formazione di spicole e vescicole sulla superficie cellulare.

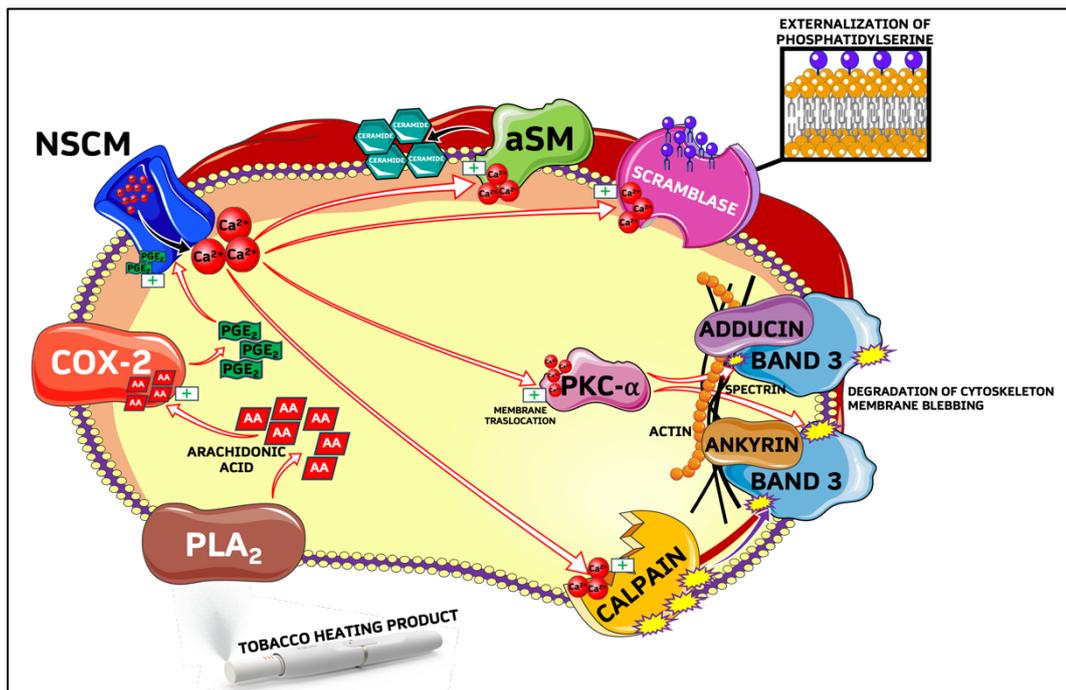


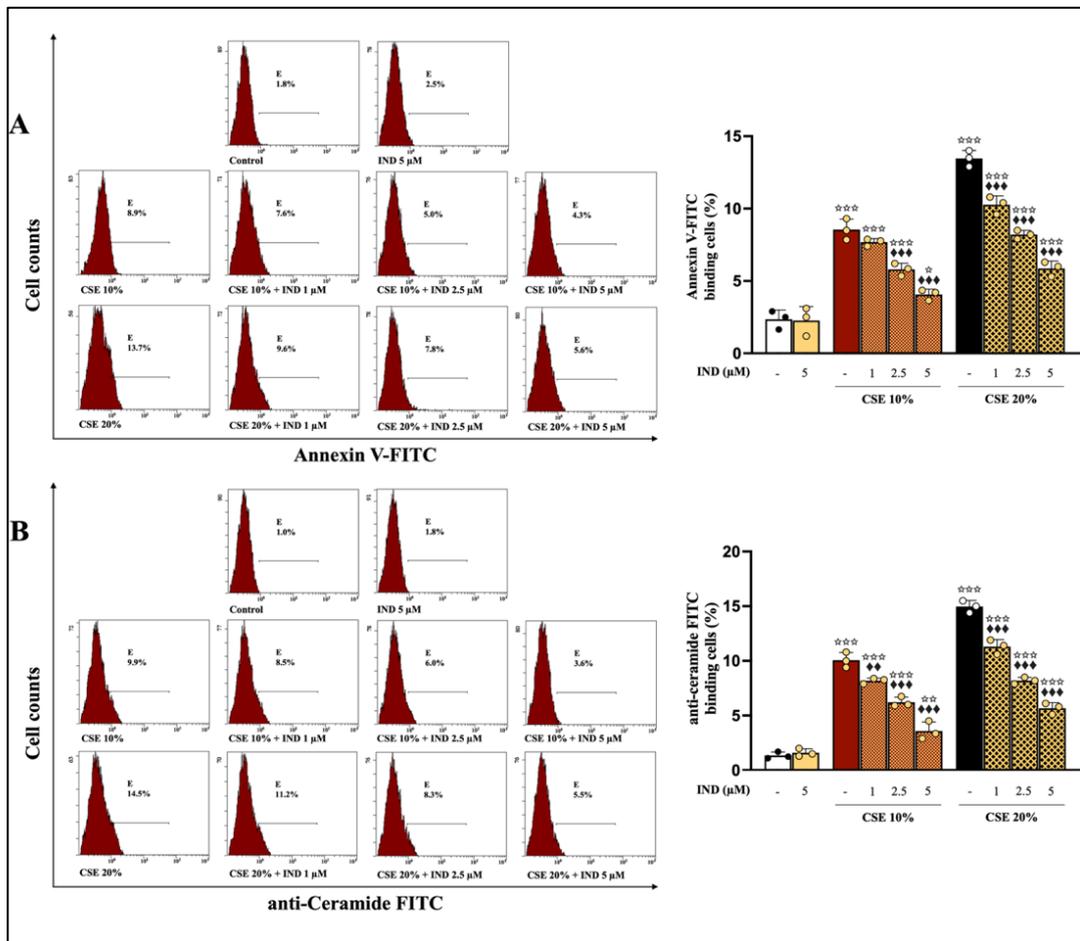
Figura 25. Immagine riassuntiva del pathway di eriptosi indotto da THPE.

## 4.2 Studio del meccanismo di protezione dell'indicaxantina da *Opuntia ficus indica* su eriptosi estrinseca indotta da CSE

### 4.2.1 L'indicaxantina inibisce l'eriptosi indotta da CSE

I globuli rossi umani isolati sono stati esposti per 3 ore a CSE al 10% o al 20%, in assenza o in presenza di IND a concentrazioni da 1 a 5  $\mu$ M. Come mostrato nella Figura 26, il CSE ha aumentato due dei principali segni distintivi dell'eriptosi, ovvero l'esternalizzazione della PS sul foglietto esterno della membrana (A) e la formazione di ceramide (B), misurate mediante citometria a flusso attraverso la colorazione con annexin V-FITC e un anticorpo secondario marcato, rispettivamente. L'IND, in maniera dipendente dalla concentrazione, ha ridotto

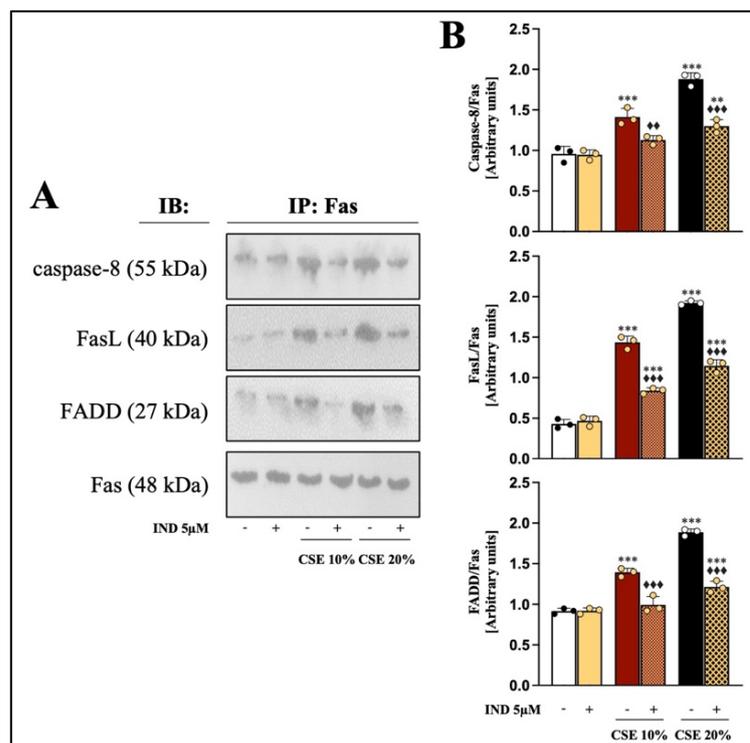
l'aumento indotto dal CSE sia delle cellule fluorescenti leganti l'annexin V (Figura 26A) sia dei livelli di ceramide (Figura 26B) in ciascuna condizione di trattamento. Nei globuli rossi esposti a CSE al 10%, l'IND a 5  $\mu$ M ha inibito l'esternalizzazione della PS e la produzione di ceramide rispettivamente del 75% e dell'80%. L'effetto protettivo di 5  $\mu$ M di IND nei globuli rossi trattati con CSE al 20% è stato leggermente inferiore, con un'inibizione dell'esternalizzazione della PS e della formazione di ceramide di circa il 67% e il 65%, rispettivamente. Nessun effetto apprezzabile dell'IND è stato evidente in assenza di CSE (Figura 26).



**Figura 26.** Analisi citofluorimetrica di eritrociti che espongono PS (A) e dei livelli di ceramide (B) in eritrociti esposti per 3 h al veicolo o al CSE in assenza o presenza di IND. I valori sono espressi come medie  $\pm$  SD di tre esperimenti indipendenti eseguiti in triplicato. ☆  $p < 0,05$ , ☆☆☆  $p < 0,001$  rispetto al controllo; ◆◆  $p < 0,01$ , ◆◆◆  $p < 0,001$  rispetto al trattamento con CSE (ANOVA-one way associato a Tukey test).

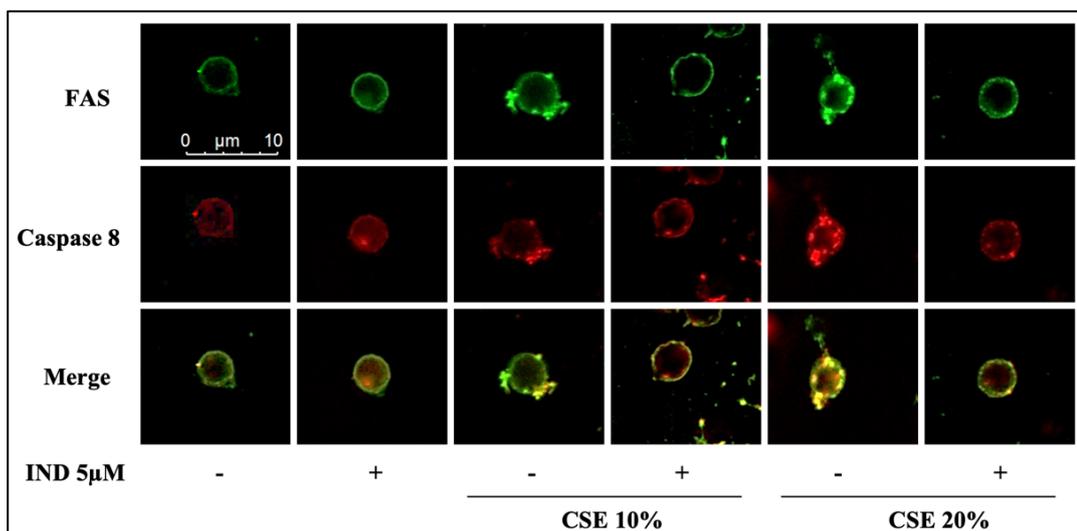
#### **4.2.2 L'indicaxantina inibisce l'assemblaggio del death-inducing signaling complex (DISC) indotto da CSE**

Gli eritrociti umani isolati sono stati pre-incubati per 1 h con 5  $\mu$ M IND prima dell'aggiunta di CSE al 10% o al 20%. Il trattamento è stato protratto per 3 ore per mimare l'intervallo di tempo durante il quale, nell'uomo, il pigmento ingerito con l'assunzione di frutti di fico d'india, raggiunge la massima concentrazione plasmatica e l'incorporazione negli eritrociti circolanti [102,103]. L'assemblaggio di DISC nelle RBC è implicato nel meccanismo della citotossicità di CSE [85]. L'effetto di IND 5  $\mu$ M sul reclutamento indotto da CSE nella membrana del ligando di Fas (FasL), del dominio di morte associato a Fas (FADD) e della caspasi 8 è stato studiato mediante tecnica di immunoprecipitazione con anti-Fas seguita da western blotting dell'immunoprecipitato con l'anticorpo appropriato. L'analisi densitometrica dei blot ha mostrato che l'IND ha ridotto le quantità di ciascun componente proteico del DISC negli immunoprecipitati delle RBC trattate con CSE (Fig. 27). Rispetto alle RBC trattate con il 10% di CSE da solo, IND ha impedito il reclutamento in membrana di FADD e caspasi 8, mentre ha ridotto la presenza di FasL di circa l'80%. L'inibizione della formazione del complesso DISC nelle RBC trattate con il 20% di CSE è stata più debole di quella riscontrata nelle RBC esposte al 10% di CSE, ma statisticamente significativa. Rispetto alle RBC trattate con il 20% di CSE da solo, l'IND ha inibito il reclutamento in membrana di FasL, FADD e caspasi 8 rispettivamente di 53%, 69% e 63%.



**Figura 27.** Immagini rappresentative delle immunodetezioni di caspasi-8, FasL e FADD dopo immunoprecipitazione con anticorpo anti-Fas (A) in eritrociti pre-incubati in presenza o in assenza di IND per 1 h prima del trattamento di 3 h con CSE. Analisi densitometrica dei livelli di caspasi-8, FasL e FADD normalizzati per Fas (B). I valori sono le medie  $\pm$  SD della densitometria delle bande di tre esperimenti indipendenti con risultati comparabili. \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  contro il controllo;  $\blacklozenge$   $p < 0,01$ ,  $\blacklozenge\blacklozenge$   $p < 0,001$  contro il trattamento corrispondente con CSE (ANOVA-one way associato a Tukey test).

L'analisi con microscopia confocale è stata eseguita per confermare l'associazione del recettore Fas con la caspasi 8 indotta dalla CSE e l'inibizione della IND. Nelle RBC non trattate, l'immunomarcatura di Fas indicava la presenza del recettore diffuso nella membrana plasmatica, mentre la caspasi 8 appariva dispersa nel citosol. Il trattamento delle cellule con CSE al 10% o al 20% ha causato l'associazione di Fas in chiazze localizzate e la traslocazione della caspasi 8 sulla membrana (Fig. 28). Il merge delle immagini ha suggerito che la caspasi 8 è co-localizzata con Fas nella membrana citoplasmatica. La presenza di IND ha inibito la clusterizzazione di Fas nella membrana e l'associazione con la caspasi 8 in ogni condizione di trattamento. Nel complesso, questi risultati indicano che IND ha inibito l'assemblaggio di DISC indotto da CSE nella membrana delle RBC.

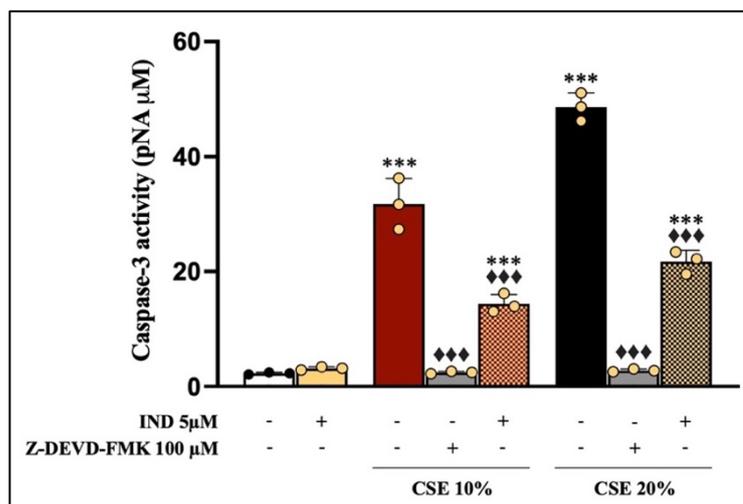


**Figura 28.** Immagini rappresentative di immunofluorescenza di Fas e caspasi-8 di eritrociti pre-incubati in assenza (controllo) o in presenza di IND per 1 h prima del trattamento di 3 h con CSE. Barra = 10 µm per tutti i pannelli. La co-localizzazione di Fas e caspasi-8 è stata rivelata dopo il merge. Le immagini sono rappresentative di due esperimenti indipendenti.

#### **4.2.3 L'indicaxantina inibisce l'attivazione delle caspasi e di p38 MAPK indotta da CSE**

È stato dimostrato che l'assemblaggio di DISC indotto da CSE negli eritrociti è avviato dall'attivazione di p38 MAPK e seguito dal clivaggio della caspasi 8/caspasi 3 <sup>[85]</sup>. L'analisi di immunoblotting ha dimostrato che la pre-incubazione degli eritrociti con IND 5 µM riduceva fortemente i livelli indotti dal CSE sia di p-p38 MAPK attiva che delle forme clivate di caspasi 8 e caspasi 3 (Figura 29).

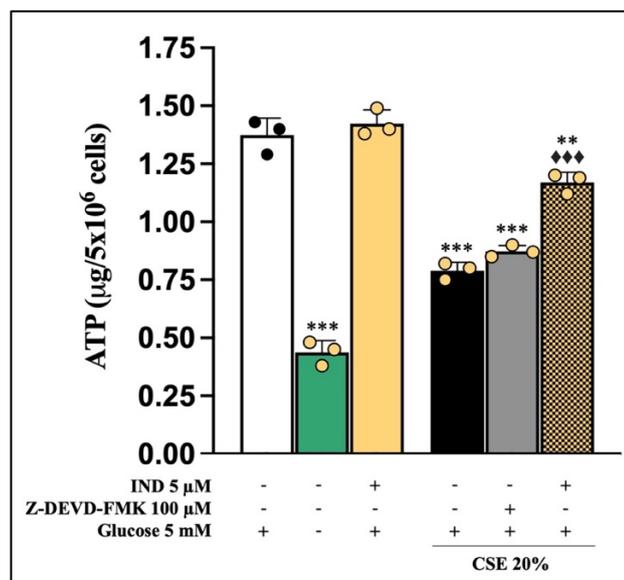




**Figura 30.** Misura dell'attività enzimatica di caspasi-3 in eritrociti pre-incubati in assenza (controllo) o in presenza di IND o Z-DEVD-FMK per 1 h prima del trattamento di 3 h con CSE. I valori sono le medie  $\pm$  SD di tre esperimenti indipendenti condotti in triplicato. \*\*\*  $p < 0,001$  contro il controllo; ◆◆◆  $p < 0,001$  contro il rispettivo trattamento con CSE (ANOVA- one way associato al Tukey test).

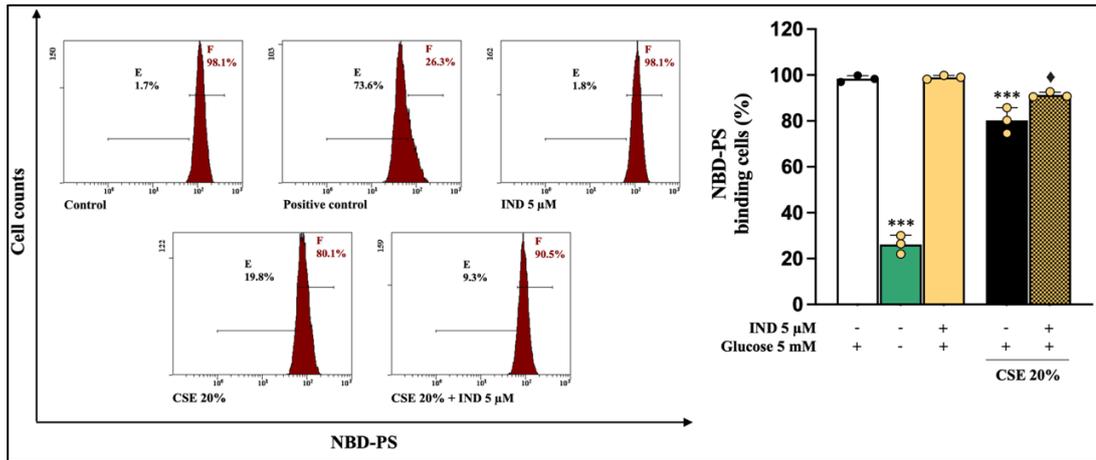
#### 4.2.4 L'indicaxantina inibisce la deplezione di ATP indotta da CSE e la compromissione dell'attività di APLT

Abbiamo indagato se l'attivazione della via estrinseca da parte del CSE influenzasse la concentrazione di ATP citosolico. Rispetto agli eritrociti controllo, la concentrazione di ATP negli eritrociti esposti per 3 ore al 20% di CSE era significativamente più bassa ( $1,37 \pm 0,12$  contro  $0,79 \pm 0,04 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) (Fig. 31). La pre-incubazione con l'inibitore della caspasi 3 Z-DEVD-FMK prima del trattamento con CSE non ha prodotto alcun recupero significativo della deplezione di ATP indotta da CSE, indicando che la perdita di energia metabolica precede la fase esecutiva della morte cellulare, nella nostra condizione di incubazione. Al contrario, 5  $\mu\text{M}$  IND ha preservato fortemente la concentrazione di ATP, che ha raggiunto circa l'85% del valore di controllo. Come controllo positivo, è stata determinata una profonda diminuzione della concentrazione di ATP negli eritrociti incubati in Ringer senza glucosio.



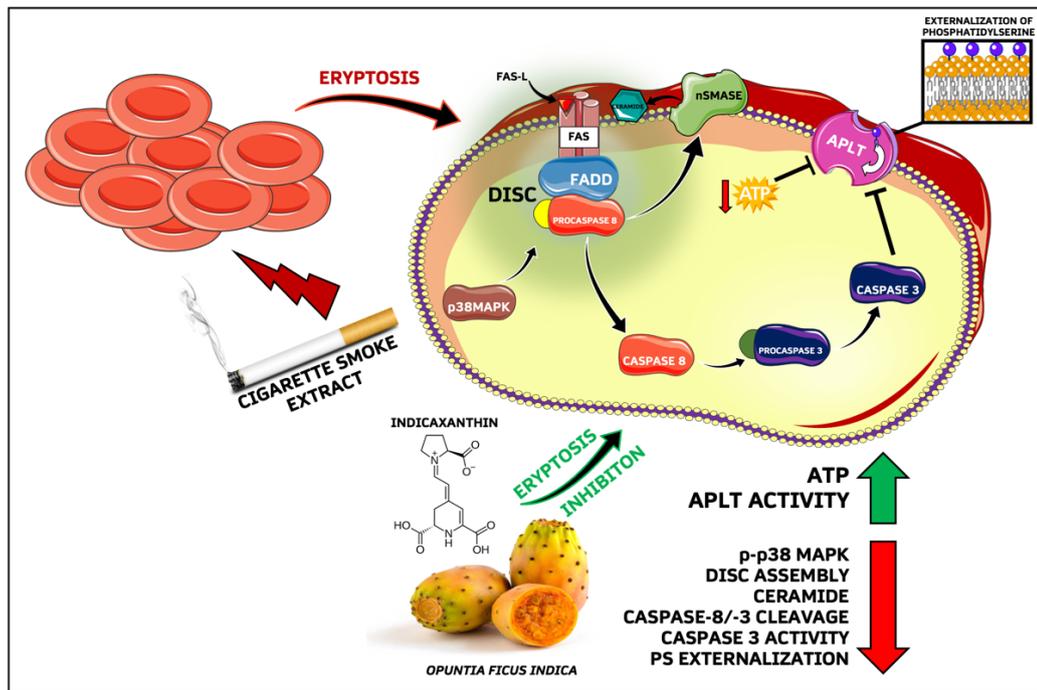
**Figura 31.** Misura dei livelli di ATP intracellulari in eritrociti pre-incubati in assenza (controllo) e in presenza di Z-DEVD-FMK o IND per 1 h prima del trattamento di 3 h con CSE. Come controllo positivo, le cellule sono state pre-incubate in RINGER con 5 mM di glucosio. I valori sono la media  $\pm$  SD di tre esperimenti indipendenti condotti in triplo. \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  contro il controllo; ◆◆◆  $p < 0,001$  contro il rispettivo trattamento con CSE (ANOVA-one way associato al Tukey test).

La riduzione dei livelli di ATP cellulare può influenzare l'attività APLT, una flippasi di membrana ATP-dipendente, che trasporta PS e, in misura minore, PE, dal foglietto esterno a quello interno della membrana plasmatica contro il gradiente di concentrazione. L'inibizione di APLT comporta la perdita della simmetria di membrana con una maggiore esposizione del fosfolipide fosfatidilserina (PS) all'esterno della membrana. Abbiamo valutato l'attività di APLT in eritrociti esposti al CSE e l'effetto di IND mediante citometria a flusso, determinando la percentuale di fosfatidilserina marcata con fluorescenza (NBD-PS) traslocata dal foglietto esterno a quello interno della membrana. Pertanto, le cellule NBD-PS negative sono cellule in cui la flippasi è inibita. Rispetto agli eritrociti controllo, il trattamento per 3 ore delle cellule con il 20% di CSE ha causato una diminuzione del 20% della fluorescenza cellulare associata a NBD-PS (Fig. 32). Il pretrattamento delle cellule con IND 5 µM ha contrastato la compromissione dell'attività APLT indotta dalla CSE, come dimostra il valore più alto di cellule NBD-PS positive.



**Figura 32.** Misura dell'attività della APL-translocasi (APLT) in eritrociti pre-incubati in assenza (controllo) o in presenza di IND per 1 h prima del trattamento di 3 h con CSE. Come controllo positivo, le cellule sono state pre-incubate in RINGER con 5 mM di glucosio. I valori sono la media  $\pm$  SD di tre esperimenti indipendenti condotti in triplicato. \*\*\*  $p < 0,001$  contro il controllo; ♦  $p < 0,05$  contro il rispettivo trattamento con CSE (ANOVA-one way associato al Tukey test).

Nel complesso, questi risultati indicano che il fitochimico indicaxantina, prevenendo la deplezione di ATP indotta dal CSE, può preservare il trasporto interno di PS mediato da APLT.



**Figura 33.** Immagine riassuntiva del pathway di inibizione dell'indicaxantina di eriptosi estrinseca indotta da CSE.

## 5 CONCLUSIONI

Il fumo di sigaretta convenzionale rappresenta ancora oggi un noto e significativo fattore di rischio per lo sviluppo di patologie cardiovascolari. Negli ultimi due decenni, prodotti di fumo alternativi, come i dispositivi a tabacco riscaldato (THP) e le sigarette elettroniche (eCig), hanno guadagnato ampio consenso nel mercato del tabacco come strumenti alternativi considerati meno dannosi, volti a soddisfare la dipendenza da nicotina. Tuttavia, recenti evidenze scientifiche, derivate da studi condotti su colture cellulari e modelli animali, hanno messo in dubbio la presunta innocuità di questi dispositivi, dimostrando che possono indurre effetti nocivi. L'obiettivo del presente lavoro è stato quello di analizzare i potenziali effetti tossici dei componenti del vapore o aerosol emessi da prodotti di fumo alternativi sugli eritrociti, confrontandoli con quelli prodotti dal fumo di sigaretta tradizionale. Inoltre, è stata condotta un'indagine sui possibili meccanismi molecolari responsabili di tali effetti. Abbiamo dimostrato che, nelle nostre condizioni di studio, estratti di vapore di THP danneggiano la vitalità degli RBCs, sebbene in misura meno aggressiva dell'estratto di fumo di sigaretta tradizionale quando confrontati a parità di concentrazione. Aerosol di nicotina prodotto da eCig sembra inefficace nel modificare la vitalità delle cellule. A questo proposito, comunque, si deve specificare che noi non abbiamo incluso nel liquido di nicotina usato nella eCig alcun aroma. Mediante investigazione meccanicistica, lo studio dimostra che l'effetto citotossico di THPE è mediato da un meccanismo  $Ca^{2+}$  dipendente che implica attivazione di COX, coinvolge Proteina chinasi C ed è indipendente dal DISC e dall'attività di caspasi 3. Inoltre, al meglio delle nostre conoscenze della letteratura scientifica, i nostri dati per la prima volta indagano sulla modifica della struttura proteica di membrana nell'eriprosi. Alla luce della ben nota relazione tra

eriptosi e danno endoteliale nell'uomo, noi crediamo che questo studio contribuisca a considerare il fumo da THP, come iQOS, un fattore di rischio per la salute.

In conclusione, possiamo inoltre affermare che IND, a concentrazione di rilevanza nutrizionale, è in grado di inibire l'eriptosi estrinseca indotta dal CSE. Infatti, utilizzata per il trattamento alla concentrazione di 5  $\mu$ M, coerentemente con i livelli plasmatici fisiologici ottenuti a 4 ore dall'ingestione di 400g di polpa di *Opuntia ficus-indica* giallo, contrasta l'eriptosi inibendo l'assemblaggio del complesso DISC e il reclutamento in membrana di Fas, FADD e caspasi 8. Questi risultati sono corroborati dalle immagini di microscopia confocale che mostrano come il trattamento con il fitochimico ha inibito la clusterizzazione del recettore di membrana Fas e il reclutamento della caspasi 8 dal citoplasma alla membrana. IND, inoltre, ha inibito l'attività della caspasi 3, esecutrice del programma di morte cellulare, indotta dal CSE. Abbiamo dimostrato anche che il fitochimico è in grado di inibire la deplezione di ATP causata dal trattamento con il CSE. Poiché la pre-incubazione con l'inibitore della caspasi non ha prodotto alcun recupero della deplezione di ATP indotta da CSE, possiamo concludere che la perdita energetica è un evento che precede l'esecuzione della morte cellulare. Infine, il trattamento con IND ripristinava l'attività di APLT, flippasi di membrana ATP-dipendente, che opera la traslocazione di PS dal foglietto esterno a quello interno della membrana plasmatica. La riduzione dell'esternalizzazione di fosfatidilserina osservata inizialmente - non accoppiata ad un incremento della concentrazione del calcio intracellulare - sarebbe dunque una conseguenza diretta della riduzione di deplezione energetica indotta dal trattamento con il fitochimico.

## 6 BIBLIOGRAFIA

1. Arese P, Turrini F, Schwarzer E. Band 3/complement-mediated recognition and removal of normally senescent and pathological human erythrocytes. *Cell Physiol Biochem* 2005;16:133–46.
2. Lang E, Qadri SM, Lang F. Killing me softly – suicidal erythrocyte death. *Int J Biochem Cell Biol* 2012;44:1236–43.
3. Föller, M., Huber, S. M., & Lang, F. (2008). Erythrocyte programmed cell death. *IUBMB life*, 60(10), 661-668.
4. F. Lang and S. M. Qadri, “Mechanisms and significance of eryptosis, the suicidal death of erythrocytes,” *Blood Purification*, vol. 33, no. 1–3, pp. 125–130, 2012.
5. Elliott, Steve, et al. «Erythropoietins: A Common Mechanism of Action». *Experimental Hematology*, vol. 36, n. 12, dicembre 2008, pagg. 1573–84.
6. Lang KS, Durantion C, Poehlmann H, Myssina S, Bauer C, Lang F, et al. Cation channels trigger apoptotic death of erythrocytes. *Cell Death Differ* 2003;10:249–56.
7. Klarl BA, Lang PA, Kempe DS, Niemoeller OM, Akel A, Sobiesiak M, et al. Protein kinase C mediates erythrocyte programmed cell death following glucose depletion. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;290:C244–53.
8. Lang F, Abed M, Lang E, Foller M. Oxidative stress and suicidal erythrocyte death. *Antioxid Redox Signal* 2014;21:138–53.
9. Foller M, Mahmud H, Gu S, Wang K, Floride E, Kucherenko Y, et al. Participation of leukotriene C (4) in the regulation of suicidal erythrocyte death. *J Physiol Pharmacol* 2009;60:135–43.
10. O. M. Niemoeller, V. Kiedaisch, P. Dreischer, T. Wieder, and F. Lang, “Stimulation of eryptosis by aluminium ions,” *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 217, no. 2, pp. 168–175, 2006.
11. M. Föller, C. Geiger, H. Mahmud, J. Nicolay, and F. Lang, “Stimulation of suicidal erythrocyte death by amantadine,” *European Journal of Pharmacology*, vol. 581, no. 1-2, 2008.
12. J. P. Nicolay, P. J. Bentzen, M. Ghashghaieinia, T. Wieder, and F. Lang, “Stimulation of erythrocyte cell membrane scrambling by amiodarone,” *Cellular Physiology and Biochemistry*, vol. 20, no.6, 2007.
13. M. Sopjani, M. Föller, P. Dreischer, and F. Lang, “Stimulation of eryptosis by cadmium ions,” *Cellular Physiology and Biochemistry*, vol. 22, 2008.

14. S. K. Bhavsar, D. Bobbala, N. T. Xuan, M. Föller, and F. Lang, "Stimulation of suicidal erythrocyte death by  $\alpha$ -lipoic acid," *Cellular Physiology and Biochemistry*, vol.26, no.6, 2010.
15. Ahmed MS, Langer H, Abed M, Voelkl J, Lang F. The uremic toxin acrolein promotes suicidal erythrocyte death, *Kidney Blood Press Res.* 2013
16. Tesoriere, Luisa, et al. «Oxysterol Mixture in Hypercholesterolemia-Relevant Proportion Causes Oxidative Stress-Dependent Eryptosis». *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, vol. 34, n. 4, 2014, pagg. 1075–89.
17. Pretorius, Ethersia, et al. «A Comprehensive Review on Eryptosis». *Cellular Physiology and Biochemistry*, vol. 39, n. 5, 2016, pagg. 1977–2000.
18. Repsold, Lisa, e Anna Margaretha Joubert. «Eryptosis: An Erythrocyte's Suicidal Type of Cell Death». *BioMed Research International*, 3 gennaio 2018.
19. A. D. Maher and P. W. Kuchel, "The Gardos channel: A review of the Ca<sup>2+</sup>- activated K<sup>+</sup> channel in human erythrocytes," *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 35, no. 8, pp. 1182–1197, 2003.
20. Restivo, Ignazio, et al. «Suicidal Erythrocyte Death in Metabolic Syndrome». *Antioxidants*, vol. 10, n. 2, febbraio 2021, pag. 154.
21. Velásquez, Fernanda Carrizo, et al. «Induction of Eryptosis by Low Concentrations of E. Coli Alpha-Hemolysin». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1848, n. 11, novembre 2015, pagg. 2779–88.
22. C. P. Berg, I.H. Engels, A. Rothbart et al., "Human mature red blood cells express caspase-3 and caspase-8, but are devoid of mitochondrial regulators of apoptosis," *Cell Death & Differentiation*, vol. 8, no. 12, pp. 1197–1206, 2001.
23. Mandal, Debabrata, et al. «Fas-, Caspase 8-, and Caspase 3-Dependent Signaling Regulates the Activity of the Aminophospholipid Translocase and Phosphatidylserine Externalization in Human Erythrocytes». *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, n. 47, novembre 2005, pagg. 39460–67.
24. Lang, Philipp A., et al. «Stimulation of Erythrocyte Ceramide Formation by Platelet-Activating Factor». *Journal of Cell Science*, vol. 118, n. 6, marzo 2005, pagg. 1233–43.

25. Zhou Q, Zhao J, Wiedmer T, Sims PJ: Normal hemostasis but defective hematopoietic response to growth factors in mice deficient in phospholipid scramblase 1. *Blood* 2002;99:4030-4038.
26. Kolesnick, Richard. «The Therapeutic Potential of Modulating the Ceramide/Sphingomyelin Pathway». *Journal of Clinical Investigation*, vol. 110, n. 1, luglio 2002, pagg. 3–8.
27. Lang, Florian, et al. «Ceramide in Suicidal Death of Erythrocytes». *Cellular Physiology and Biochemistry*, vol. 26, n. 1, 2010, pagg. 21–28.
28. Gatidis, Sergios, et al. «P38 MAPK Activation and Function Following Osmotic Shock of Erythrocytes». *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, vol. 28, n. 6, 2011, pagg. 1279–86.
29. Klarl, Barbara A., et al. «Protein Kinase C Mediates Erythrocyte “Programmed Cell Death” Following Glucose Depletion». *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, vol. 290, n. 1, gennaio 2006, pagg. C244–53.
30. Boas, F. E., et al. «Phosphatidylserine Exposure and Red Cell Viability in Red Cell Aging and in Hemolytic Anemia». *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 95, n. 6, marzo 1998, pagg. 3077–81.
31. Hoffman D, Wynder EL. Chemical constituent and bioactivity of tobacco smoke. *LARC - Tobacco: a major international health hazard*. Lyon: LARC Scientific Publications, Peto Ed, 1986; 74: 145-65.
32. Stedman, Russell L. «Chemical Composition of Tobacco and Tobacco Smoke». *Chemical Reviews*, vol. 68, n. 2, aprile 1968, pagg. 153–207.
33. Church D F e Pryor W A. «Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications.» *Environmental Health Perspectives*, vol. 64, dicembre 1985, pagg. 111–26.
34. PMI. Heets and Heatsticks. Available online: <https://www.pmi.com/glossary-section/glossary/heets-and-heatsticks> (accessed on 5 July 2022).
35. Polosa R, O'Leary R, Tashkin D, Emma R, Caruso M. The effect of e-cigarette aerosol emissions on respiratory health: a narrative review. *Expert Rev Respir Med*. 2019;13(9):899-915.
36. Sutherland G, Russell MA, Stapleton JA, Feyerabend C. Glycerol particle cigarettes: a less harmful option for chronic smokers. *Thorax*. 1993;48(4):385-387.
37. Woodson PP, Fagerstrom KO, Molander L, Slade J, Henningfeld JE. Premier: a new nicotine delivery system - Studies on its environmental and biological impact. *J Smoking-Related Dis* 1993;4:191-201.

38. van der Toorn M, Frentzel S, De Leon H, Goedertier D, Peitsch MC, Hoeng J. Aerosol from a candidate modified risk tobacco product has reduced effects on chemotaxis and transendothelial migration compared to combustion of conventional cigarettes. *Food Chem Toxicol.* 2015;86:81-87.
39. Farsalinos, K. E., Yannovits, N., Sarri, T., Voudris, V., & Poulas, K. (2018). Nicotine delivery to the aerosol of a heat-not-burn tobacco product: comparison with a tobacco cigarette and e-cigarettes. *Nicotine and Tobacco Research*, 20(8), 1004-1009.
40. Wölkart, G., Kollau, A., Stessel, H., Russwurm, M., Koesling, D., Schrammel, A., ... & Mayer, B. (2019). Effects of flavoring compounds used in electronic cigarette refill liquids on endothelial and vascular function. *PLoS One*, 14(9), e0222152.
41. Barrington-Trimis JL, Samet JM, McConnell R. Flavorings in electronic cigarettes: an unrecognized respiratory health hazard? *JAMA* 312: 2493–2494, 2014.
42. International Agency for Research on Cancer (IARC). IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals man. Tobacco smoking. Lyon: World Health Organization, 1986: 38.
43. Ness-Jensen, Eivind, e Jesper Lagergren. «Tobacco Smoking, Alcohol Consumption and Gastro-Oesophageal Reflux Disease». *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology*, vol. 31, n. 5, ottobre 2017, pagg. 501–08.
44. Savin, Ziv, et al. «Smoking and the Intestinal Microbiome». *Archives of Microbiology*, vol. 200, n. 5, luglio 2018, pagg. 677–84.
45. Camilli AE, Burrows B, Knudson RF, Lyle SK, Lebowitz MD. Longitudinal changes in FEV1 in adults: effects of smoking and smoking cessation. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135: 794-9.
46. Strzelak, Agnieszka, et al. «Tobacco Smoke Induces and Alters Immune Responses in the Lung Triggering Inflammation, Allergy, Asthma and Other Lung Diseases: A Mechanistic Review». *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 15, n. 5, maggio 2018.
47. Calogero, Aldo E., et al. «Epidemiology and Risk Factors of Lower Urinary Tract Symptoms/Benign Prostatic Hyperplasia and Erectile Dysfunction». *The Aging Male: The Official Journal of the International Society for the Study of the Aging Male*, vol. 22, n. 1, marzo 2019, pagg. 12– 19.
48. Messner, Barbara, e David Bernhard. «Smoking and Cardiovascular Disease: Mechanisms of Endothelial Dysfunction and Early Atherogenesis». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 34, n. 3, marzo 2014, pagg. 509–15.

49. Kondo, Takahisa, et al. «Effects of Tobacco Smoking on Cardiovascular Disease». *Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society*, vol. 83, n. 10, settembre 2019, pagg. 1980–85. PubMed, doi:10.1253/circj.CJ-19-0323.
50. Mackey TK, Miner A, Cuomo RE. 2015. Exploring the e-cigarette e-commerce marketplace: identifying Internet e-cigarette marketing characteristics and regulatory gaps. *Drug Alcohol Depend.* 156:97–103.
51. Sommerfeld CG, Weiner DJ, Nowalk AN, Larkin A. 2018. Hypersensitivity pneumonitis and acute respiratory distress syndrome from e-cigarette use. *Pediatrics.* 141(6):e20163927.
52. Arter ZL, Wiggins A, Hudspath C, Kisling A, Hostler DC, Hostler JM. 2019. Acute eosinophilic pneumonia following electronic cigarette use. *Respir Med Case Rep.* 27:100825.
53. Butt YM, Smith ML, Tazelaar HD, Vaszar LT, Swanson KL, Cecchini MJ, Boland JM, Bois MC, Boyum JH, Froemming AT, et al. 2019. Pathology of vaping-associated lung injury. *N Engl J Med.* 381(18):1780–1781.
54. Layden JE, Ghinai I, Pray I, Kimball A, Layer M, Tenforde M, Navon L, Hoots B, Salvatore P, Elderbrook M, et al. 2020. Pulmonary illness related to e-cigarette use in Illinois and Wisconsin – preliminary report. *N Engl J Med.* 382(10):903–916.
55. Kalininskiy A, Bach CT, Nacca NE, Ginsberg G, Marraffa J, Navarette KA, McGraw MD, Croft DP. 2019. E-cigarette, or vaping, product use associated lung injury (EVALI): case series and diagnostic approach. *Artic Lancet Respir Med.* 7(12):1017–1026.
56. Kreiss K, Gomaa A, Kullman G, Fedan K, Simoes EJ, Enright PL. 2002. Clinical bronchiolitis obliterans in workers at a microwave-popcorn plant. *N Engl J Med.* 347(5):330–338.
57. Pierce JS, Abelman A, Spicer LJ, Adams RE, Finley BL. 2014. Diacetyl and 2,3-pentanedione exposures associated with cigarette smoking: implications for risk assessment of food and flavoring workers. *Crit Rev Toxicol.* 44(5):420–435.
58. Farsalinos KE, Kistler KA, Gillman G, Voudris V. 2015. Evaluation of electronic cigarette liquids and aerosol for the presence of selected inhalation toxins. *Nicotine Tob Res.* 17(2):168–174.
59. Allen JG, Flanigan SS, LeBlanc M, Vallarino J, MacNaughton P, Stewart JH, Christiani DC. 2016. Flavoring chemicals in e-cigarettes: diacetyl, 2,3-pentanedione, and acetoin in a sample of 51 products, including fruit-, candy-, and cocktail-flavored e-cigarettes. *Environ Health Perspect.* 124(6):733–739.

60. Rutledge R. 2018. Gasping for action: lab tests reveal popular e-cigarette liquids contain harmful chemicals. *Milwaukee J Sentin*.
61. McConnell R, Barrington-Trimis JL, Wang K, Urman R, Hong H, Unger J, Samet J, Leventhal A, Berhane K. 2017. Electronic cigarette use and respiratory symptoms in adolescents. *Am J Respir Crit Care Med*. 195(8):1043–1049.
62. Kotoulas S-C, Pataka A, Domvri K, Spyrtos D, Katsaounou P, Porpodis K, Fouka E, Markopoulou A, Passa-Fekete K, Grigoriou I, et al. 2020. Acute effects of e-cigarette vaping on pulmonary function and airway inflammation in healthy individuals and in patients with asthma. *Respirology*.
63. Garcia-Arcos I, Geraghty P, Baumlin N, Campos M, Dabo AJ, Jundi B, Cummins N, Eden E, Grosche A, Salathe M, et al. 2016. Chronic electronic cigarette exposure in mice induces features of COPD in a nicotine-dependent manner. *Thorax*. 71(12):1119–1129.
64. Alzahrani T, Pena I, Temesgen N, Glantz SA. 2018. Association between electronic cigarette use and myocardial infarction. *Am J Prev Med*. 55(4):455–461.
65. Cooke WH, Pokhrel A, Dowling C, Fogt DL, Rickards CA. 2015. Acute inhalation of vaporized nicotine increases arterial pressure in young non-smokers: a pilot study. *Clin Auton Res*. 25(4):267–270.
66. Carnevale R, Sciarretta S, Violi F, Nocella C, Loffredo L, Perri L, Peruzzi M, Marullo AGM, De Falco E, Chimenti I, et al. 2016. Acute impact of tobacco vs electronic cigarette smoking on oxidative stress and vascular function. *Chest*. 150(3):606–612.
67. Antoniewicz L, Brynedal A, Hedman L, Lundbeck M, Bosson JA. 2019. Acute effects of electronic cigarette inhalation on the vasculature and the conducting airways. *Cardiovasc Toxicol*. 19(5):441–450.
68. Espinoza-Derout J, Hasan KM, Shao XM, Jordan MC, Sims C, Lee DL, Sinha S, Simmons Z, Mtume N, Liu Y, et al. 2019. Chronic intermittent electronic cigarette exposure induces cardiac dysfunction and atherosclerosis in apolipoprotein-E knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 317(2):H445–H459.
69. Lee WH, Ong SG, Zhou Y, Tian L, Bae HR, Baker N, Whitlatch A, Mohammadi L, Guo H, Nadeau KC, et al. 2019. Modeling cardiovascular risks of e-cigarettes with human-induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells. *J Am Coll Cardiol*. 73(21):2722–2737.
70. Glasser AM, Collins L, Pearson JL, Abudayyeh H, Niaura RS, Abrams DB, Villanti AC. 2017. Overview of electronic nicotine delivery systems: a systematic review. *Am J Prev Med*. 52(2):e33–e66.

71. Glantz SA. PMI's own in vivo clinical data on biomarkers of potential harm in Americans show that IQOS is not detectably different from conventional cigarettes. *Tob Control* 27, Suppl 1: s9–s12, 2018. doi:10.1136/tobaccocontrol-2018-054413.
72. Biondi-Zoccai G, et al. Acute effects of heat-not-burn, electronic vaping, and traditional tobacco combustion cigarettes: the Sapienza University of Rome-Vascular Assessment of Proatherosclerotic Effects of Smoking (SUR-VAPES) 2 Randomized Trial. *J Am Heart Assoc* 8: e010455, 2019. doi:10.1161/JAHA.118.010455
73. Wang L, Liu X, Chen L, Liu D, Yu T, Bai R, Yan L, Zhou J. Harmful chemicals of heat not burn product and its induced oxidative stress of macrophages at air-liquid interface: Comparison with ultra-light cigarette. *Toxicol Lett* 331: 200–207, 2020. doi:10.1016/j.toxlet.2020.06.017
74. oakeimidis N, Emmanouil E, Terentes-Printzios D, Dima I, Aznaouridis K, Tousoulis D, Vlachopoulos C. Acute effect of heat-not-burn versus standard cigarette smoking on arterial stiffness and wave reflections in young smokers. *Eur J Prev Cardiol* 2047487320918365, 2020. doi:10.1177/2047487320918365.
75. Moazed F, Chun L, Matthay MA, Calfee CS, Gotts J. Assessment of industry data on pulmonary and immunosuppressive effects of IQOS. *Tob Control* 27, Suppl 1: s20–s25, 2018. doi:10.1136/tobaccocontrol-2018-054296.
76. Pataka A, Kotoulas S, Chatzopoulos E, Grigoriou I, Sapalidis K, Kosmidis C, Vagionas A, Perdikouri EI, Drevelegas K, Zarogoulidis P, Argyropoulou P. Acute effects of a heat-not-burn tobacco product on pulmonary function. *Medicina (Kaunas)* 56: 292, 2020. doi:10.3390/medicina56060292.
77. Davis B, To V, Talbot P. Comparison of cytotoxicity of IQOS aerosols to smoke from Marlboro Red and 3R4F reference cigarettes. *Toxicol In Vitro* 61: 104652, 2019. doi:10.1016/j.tiv.2019.104652.
78. Leigh NJ, Tran PL, O'Connor RJ, Goniewicz ML. Cytotoxic effects of heated tobacco products (HTP) on human bronchial epithelial cells. *Tob Control* 27, Suppl 1: s26–s29, 2018. doi:10.1136/tobaccocontrol-2018-054317.
79. Asgary, S., Naderi, G.H., Ghannady, A., 2005. Effects of cigarette smoke, nicotine and cotinine on red blood cell hemolysis and their –SH capacity. *Exp. Clin. Cardiol.* 10, 116–119.
80. Flouris, A.D., Poulianiti, K.P., Chorti, M.S., Jamurtas, A.Z., Kouretas, D., Owolabi, E.O., Tzatzarakis, M.N., Tsatsakis, A.M., Koutedakis, Y., 2012.

Acute effects of electronic and tobacco cigarette smoking on complete blood count. *Food Chem. Toxicol.* 50, 3600–3603.

81. Lakshmi, S., Lakshmanan, A., Kumar, G., Saravanan, A., 2014. Effect of intensity of cigarette smoking on haematological and lipid parameters. *J. Clin. Diagn. Res.* 8, BC11–BC13.
82. Madsen, C., Nafstad, P., Eikvar, L., Schwarze, P.E., Rønningen, K.S., Haaheim, L.L., 2007. Association between tobacco smoke exposure and levels of C-reactive protein in the Oslo II study. *Eur. J. Epidemiol.* 22, 311–317.
83. Sikdar, J., Seal, P., Roy, A., Haldar, R., 2017. Cigarette smokers develop altered erythrocyte membrane composition: an investigation unmasking the role of membrane bound integral protein GLUT 1. *Free Radic. Res. Commun.* 51, 375–388.
84. Attanzio, Alessandro, et al. «Increased Eryptosis in Smokers Is Associated with the Antioxidant Status and C-Reactive Protein Levels». *Toxicology*, vol. 411, gennaio 2019, pagg. 43–48.
85. Restivo, I.; Attanzio, A.; Giardina, I.C.; Di Gaudio, F.; Tesoriere, L.; Allegra, M. Cigarette Smoke Extract Induces p38 MAPK-Initiated, Fas-Mediated Eryptosis. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 14730.  
<https://doi.org/10.3390/ijms232314730>
86. Forman HJ. Redox signaling: An evolution from free radicals to aging. *Free Radic Biol Med.* 2016;97:398-407.  
doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.07.003
87. Zandi P, Schnug E. Reactive Oxygen Species, Antioxidant Responses and Implications from a Microbial Modulation Perspective. *Biology (Basel)*. 2022;11(2):155. Published 2022 Jan 18. doi:10.3390/biology11020155
88. Hasanuzzaman M, Bhuyan MHMB, Zulfiqar F, et al. Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense in Plants under Abiotic Stress: Revisiting the Crucial Role of a Universal Defense Regulator. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9(8):681. Published 2020 Jul 29. doi:10.3390/antiox9080681
89. Xie X, He Z, Chen N, Tang Z, Wang Q, Cai Y. The Roles of Environmental Factors in Regulation of Oxidative Stress in Plant. *Biomed Res Int.* 2019;2019:9732325. Published 2019 May 8.  
doi:10.1155/2019/9732325
90. Ursini F, Maiorino M, Forman HJ. Redox homeostasis: The Golden Mean of healthy living. *Redox Biol.* 2016;8:205-215.  
doi:10.1016/j.redox.2016.01.010
91. Forman HJ, Davies KJ, Ursini F. How do nutritional antioxidants really work: nucleophilic tone and para-hormesis versus free radical scavenging

- in vivo *Free Radic Biol Med*. 2014;66:24-35  
doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.045
92. Howitz KT, Sinclair DA. Xenohormesis: sensing the chemical cues of other species. *Cell*. 2008;133(3):387-391. doi:10.1016/j.cell.2008.04.019
93. Surh YJ. Xenohormesis mechanisms underlying chemopreventive effects of some dietary phytochemicals. *Ann N Y Acad Sci*. 2011;1229:1-6. doi:10.1111/j.1749-6632.2011.06097
94. Davies KJ. Adaptive homeostasis. *Mol Aspects Med*. 2016;49:1-7. doi:10.1016/j.mam.2016.04.007
95. Calabrese V, Cornelius C, Dinkova-Kostova AT, et al. Cellular stress responses, hormetic phytochemicals and vitagenes in aging and longevity. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1822(5):753-783. doi:10.1016/j.bbadis.2011.11.002
96. Carlos-Reyes Á, López-González JS, Meneses-Flores M, et al. Dietary Compounds as Epigenetic Modulating Agents in Cancer. *Front Genet*. 2019;10:79. Published 2019 Mar 1. doi:10.3389/fgene.2019.00079
97. Terzo S, Attanzio A, Calvi P, et al. Indicaxanthin from *Opuntia ficus-indica* Fruit Ameliorates Glucose Dysmetabolism and Counteracts Insulin Resistance in High-Fat-Diet-Fed Mice. *Antioxidants (Basel)*. 2021;11(1):80. Published 2021 Dec 29. doi:10.3390/antiox11010080
98. Attanzio A, Frazzitta A, Busa' R, Tesoriere L, Livrea MA, Allegra M. Indicaxanthin from *Opuntia ficus indica* (L. Mill) Inhibits Oxidized LDL-Mediated Human Endothelial Cell Dysfunction through Inhibition of NF- $\kappa$ B Activation. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:3457846. Published 2019 Feb 18. doi:10.1155/2019/3457846
99. Tesoriere L, Allegra M, Butera D, Gentile C, Livrea MA. Cytoprotective effects of the antioxidant phytochemical indicaxanthin in beta-thalassemia red blood cells. *Free Radic Res*. 2006;40(7):753-761. doi:10.1080/10715760600554228
100. Tesoriere L, Attanzio A, Allegra M, Gentile C, Livrea MA. Indicaxanthin inhibits NADPH oxidase (NOX)-1 activation and NF- $\kappa$ B-dependent release of inflammatory mediators and prevents the increase of epithelial permeability in IL-1 $\beta$ -exposed Caco-2 cells. *Br J Nutr*. 2014 Feb;111(3):415-23. doi: 10.1017/S0007114513002663. Epub 2013 Aug 9. PMID: 23931157.
101. Tesoriere L, Allegra M, Butera D, Gentile C, Livrea MA. Kinetics of the lipoperoxyl radical-scavenging activity of indicaxanthin in solution and unilamellar liposomes. *Free Radic Res*. 2007 Feb;41(2):226-33. doi: 10.1080/10715760601026614. PMID: 17364949

102. Tesoriere L, Allegra M, Butera D, Livrea MA. Absorption, excretion, and distribution of dietary antioxidant betalains in LDLs: potential health effects of betalains in humans. *Am J Clin Nutr.* 2004 Oct;80(4):941-5. doi: 10.1093/ajcn/80.4.941. PMID: 15447903
103. Tesoriere L, Butera D, Allegra M, Fazzari M, Livrea MA. Distribution of betalain pigments in red blood cells after consumption of cactus pear fruits and increased resistance of the cells to ex vivo induced oxidative hemolysis in humans. *J Agric Food Chem.* 2005 Feb 23;53(4):1266-70. doi: 10.1021/jf048134+. PMID: 15713051
104. Tesoriere L, Attanzio A, Allegra M, Gentile C, Livrea MA. Phytochemical indicaxanthin suppresses 7-ketocholesterol-induced THP-1 cell apoptosis by preventing cytosolic Ca(2+) increase and oxidative stress. *Br J Nutr.* 2013 Jul 28;110(2):230-40. doi: 10.1017/S000711451200493X. Epub 2012 Dec 11. PMID: 23228674.
105. Allegra M, D'Anneo A, Frazzitta A, Restivo I, Livrea MA, Attanzio A, Tesoriere L. The Phytochemical Indicaxanthin Synergistically Enhances Cisplatin-Induced Apoptosis in HeLa Cells via Oxidative Stress-Dependent p53/p21<sup>waf1</sup> Axis. *Biomolecules.* 2020 Jul 2;10(7):994. doi: 10.3390/biom10070994. PMID: 32630700; PMCID: PMC7407573
106. Tesoriere L, Attanzio A, Allegra M, Livrea MA. Dietary indicaxanthin from cactus pear (*Opuntia ficus-indica* L. Mill) fruit prevents eryptosis induced by oxysterols in a hypercholesterolaemia-relevant proportion and adhesion of human erythrocytes to endothelial cell layers. *Br J Nutr.* 2015 Aug 14;114(3):368-75. doi: 10.1017/S0007114515002111. Epub 2015 Jul 14. PMID: 26169206
107. Tesoriere L, Allegra M, Butera D, Livrea MA. Absorption, excretion, and distribution of dietary antioxidant betalains in LDLs: potential health effects of betalains in humans. *Am J Clin Nutr.* 2004;80(4):941-945. doi:10.1093/ajcn/80.4.941
108. Tesoriere L, Gentile C, Angileri F, et al. Trans-epithelial transport of the betalain pigments indicaxanthin and betanin across Caco-2 cell monolayers and influence of food matrix. *Eur J Nutr.* 2013;52(3):1077-1087. doi:10.1007/s00394-012-0414-5
109. Wang Y, Fernando GSN, Sergeeva NN, et al. Uptake and Immunomodulatory Properties of Betanin, Vulgaxanthin I and Indicaxanthin towards Caco-2 Intestinal Cells. *Antioxidants (Basel).* 2022;11(8):1627. Published 2022 Aug 22. doi:10.3390/antiox11081627
110. Lang, P. A., Kempe, D. S., Myssina, S., Tanneur, V., Birka, C., Laufer, S., Lang, F., Wieder, T., & Huber, S. M. (2005). PGE(2) in the regulation of programmed erythrocyte death. *Cell death and differentiation*, 12(5), 415–428. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401561>;

111. Kim, Y. H., An, Y. J., Jo, S., Lee, S. H., Lee, S. J., Choi, S. J., & Lee, K. (2018). Comparison of volatile organic compounds between cigarette smoke condensate (CSC) and extract (CSE) samples. *Environmental health and toxicology*, 33(3), e2018012. <https://doi.org/10.5620/eh.t.e2018012>;
112. Bentley, M. C., Almstetter, M., Arndt, D., Knorr, A., Martin, E., Pospisil, P., & Maeder, S. (2020). Comprehensive chemical characterization of the aerosol generated by a heated tobacco product by untargeted screening. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 412(11), 2675–2685. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02502-1>;
113. Kang, S. W., Park, H. J., Ban, J. Y., Chung, J. H., Chun, G. S., & Cho, J. O. (2011). Effects of nicotine on apoptosis in human gingival fibroblasts. *Archives of oral biology*, 56(10), 1091–1097. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.03.016>;
114. Mo, R., Zhang, J., Chen, Y., & Ding, Y. (2022). Nicotine promotes chronic obstructive pulmonary disease via inducing pyroptosis activation in bronchial epithelial cells. *Molecular medicine reports*, 25(3), 92. <https://doi.org/10.3892/mmr.2022.12608>;
115. Zhou, X., Sheng, Y., Yang, R., & Kong, X. (2010). Nicotine promotes cardiomyocyte apoptosis via oxidative stress and altered apoptosis-related gene expression. *Cardiology*, 115(4), 243–250. <https://doi.org/10.1159/000301278>;
116. Kim, C. S., Choi, J. S., Joo, S. Y., Bae, E. H., Ma, S. K., Lee, J., & Kim, S. W. (2016). Nicotine-Induced Apoptosis in Human Renal Proximal Tubular Epithelial Cells. *PloS one*, 11(3), e0152591. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152591>;
117. Marinucci, L., Balloni, S., Fettucciari, K., Bodo, M., Talesa, V. N., & Antognelli, C. (2018). Nicotine induces apoptosis in human osteoblasts via a novel mechanism driven by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and entailing Glyoxalase 1-dependent MG-H1 accumulation leading to TG2-mediated NF-κB desensitization: Implication for smokers-related osteoporosis. *Free radical biology & medicine*, 117, 6–17.
118. Boivin, P. (1988). Role of the phosphorylation of red blood cell membrane proteins. *Biochemical Journal*, 256(3), 689–695
119. Boivin, P., Garbarz, M., Dhermy, D., & Galand, C. (1981). In vitro phosphorylation of the red blood cell cytoskeleton complex by cyclic AMP-dependent protein kinase from erythrocyte membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 647(1), 1–6.
120. King M-J, Behrens J, Rogers C, Flynn C, Greenwood D and Chambers K. Rapid flow cytometric test for the diagnosis of membrane cytoskeleton-associated haemolytic anaemia. *British Journal of Haematology*, 2000, 111, 924±933

121. R. D. Christensen, H. M. Yaish, and P. G. Gallagher, “A pediatrician’s practical guide to diagnosing and treating hereditary spherocytosis in neonates,” *Pediatrics*, vol. 135, no. 6, pp. 1107–1114, 2015.