

A. ATZERI<sup>1</sup>, A. ROSA<sup>1</sup>,  
G. APPENDINO<sup>2</sup>, M. DEIANA<sup>1</sup>,  
A. INCANI<sup>1</sup>, M.P. MELIS<sup>1</sup>,  
D. LORU<sup>1</sup>, B. CABBOI<sup>1</sup>,  
M.A. DESSÌ<sup>1</sup>

## Comparative study of vanilloids in cell cultures

PROGRESS IN NUTRITION  
VOL. 14, N. 1, 74-80, 2012

### TITLE

Studio comparativo dei vanilloidi in colture cellulari

### KEY WORDS

*Capsicum annuum* L., antioxidants, capsiate, vanillyl alcohol, lipid peroxidation, Vero cells

### PAROLE CHIAVE

*Capsicum annuum* L., antiossidanti, capsiato, alcol vanillico, perossidazione lipidica, cellule Vero

<sup>1</sup>Dipartimento di Biologia Sperimentale, Sezione di Patologia Sperimentale, Università degli Studi di Cagliari, Cittadella Universitaria Monserrato (CA), Italia

<sup>2</sup>Discaff, Università del Piemonte Orientale, Novara, Italia

Indirizzo per la corrispondenza:

Dr. Angela Atzeri,

Dipartimento di Biologia Sperimentale, Sezione di Patologia Sperimentale, Università degli Studi di Cagliari, Cittadella Universitaria SS 554, 09042 Monserrato, Cagliari, Italia  
Tel. +39 070 6754185

Fax +39 070 6754032

E-mail: aatzeri@unica.it

### Summary

Free radical reaction of lipid peroxidation in cell membranes is responsible for the degradation of unsaturated fatty acids, and produces a variety of products that can be used as biomarkers of the extent of the oxidation. The oxidative modification of lipids in the human body is inhibited by endogenous antioxidative defence systems as well as by dietary antioxidants. Capsiate, the archetypal capsinoid, has been obtained from the fruits of a nonpungent cultivar of *Capsicum annuum* L. (CH-19 Sweet). This vanilloid compound, a simple phenol, is non-offensive and devoid of pungency, and has been shown several and interesting biological activities. In this study we have compared the activity of synthetic capsiate, a simplified analog of capsiate, and vanillyl alcohol, its hydrophilic hydrolytic metabolite, on the oxidative stress induced by *tert*-butyl hydroperoxide (TBH) in a line of fibroblasts derived from monkey kidney (Vero cells). In response to the TBH mediated oxidative stress, a reduction of the levels of total unsaturated fatty acids was observed, and a rise in the concentrations of conjugated dienes fatty acids hydroperoxides in Vero cells. Pre-treatment with both synthetic capsiate and vanillyl alcohol preserved Vero cell from oxidative damage and showed remarkable protective effect on the reduction of the levels of total unsaturated fatty acids, inhibiting the increase of MDA and hydroperoxides. Both compounds were effective against peroxidation of cell membrane lipids induced by TBH.

### Riassunto

La reazione radicalica di perossidazione lipidica nelle membrane cellulari è responsabile della degradazione degli acidi grassi insaturi e porta alla formazione di una serie di prodotti di ossidazione che possono essere utilizzati come indicatori dell'estensione del danno ossidativo. La modificazione ossidativa dei lipidi, che avviene all'interno dell'organismo umano, può essere contrastata dai sistemi di difesa antiossidanti endogeni, e dagli antiossidanti assunti tramite la dieta. Il capsiato, capsinoide modello, è stato isolato dai frutti di una cultivar non piccante di *Capsicum annuum* L. chiamata CH-19 Sweet. Questo composto vanilloide, fenolo semplice privo di potere piccante e irritante, ha mostrato interes-

santi attività biologiche. In questo lavoro è stata comparata l'attività antiossidante del capsaiato sintetico, un analogo chimico semplificato del capsaiato naturale, con quella dell'alcol vanillico, suo metabolita idrolitico idrofilico, nei confronti del danno ossidativo indotto dal *terz*-butilidroperossido (TBH) in cellule Vero, una linea immortalizzata di fibroblasti di rene di scimmia. Nelle cellule Vero, in seguito al trattamento con il TBH, è stata osservata una riduzione dei livelli degli acidi grassi insaturi e un aumento della concentrazione degli idroperossidi degli acidi grassi a dieni coniugati. Il pre-trattamento con il capsaiato sintetico e l'alcol vanillico ha preservato le cellule Vero dal danno ossidativo indotto dal TBH e ha mostrato un significativo effetto protettivo sulla riduzione degli acidi grassi insaturi, inibendo l'aumento dei livelli di MDA e di idroperossidi. Entrambi i composti sono risultati efficaci nei confronti della perossidazione dei lipidi delle membrane cellulari indotta dal TBH.

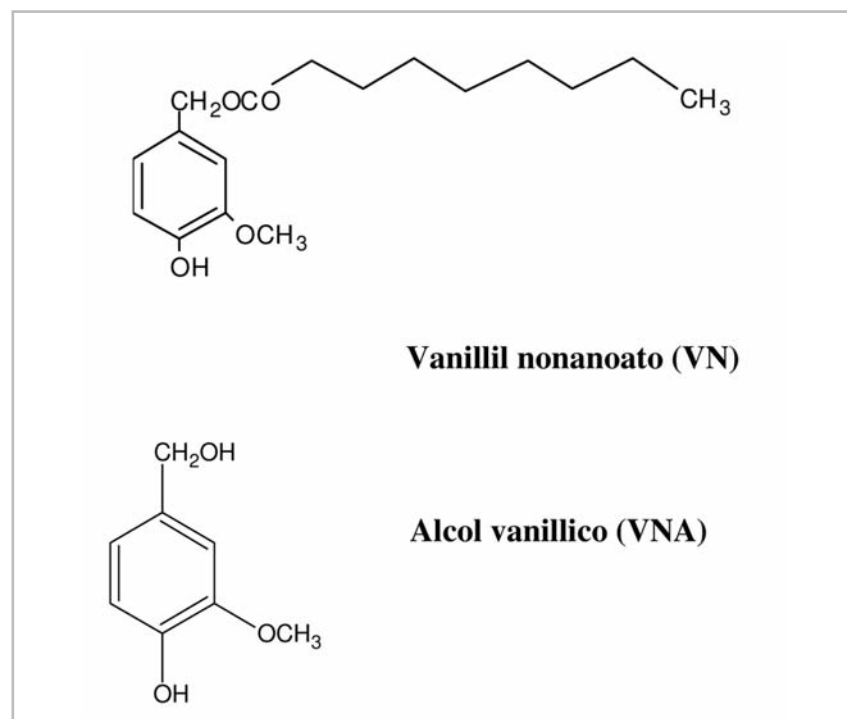
## Introduzione

Le colture cellulari sono ampiamente utilizzate come modello sperimentale per lo studio dello stress ossidativo e delle proprietà antiossidanti di un composto, utilizzando come *marker* prodotti specifici del processo ossidativo che permettono di valutare i possibili meccanismi d'azione alla base dell'effetto protettivo (1, 2). All'interno del nostro organismo, gli antiossidanti derivanti dalla dieta contrastano l'attacco ai *target* biologici da parte dei radicali liberi e partecipano ai meccanismi di riparazione cellulare, coadiuvando l'azione degli antiossidanti endogeni. Da questo principio si spiega il maggiore interesse verso studi di

monitoraggio che mettono in risalto come l'apporto di antiossidanti sia un fattore importante per la prevenzione di patologie in cui è coinvolto lo stress ossidativo; ad esempio nei paesi dell'area mediterranea, dove la dieta effettuata è caratterizzata da un'abbondanza di alimenti di origine vegetale ricchi in sostanze fenoliche ad azione antiossidante, vi è una correlazione inversa tra l'assunzione di questi alimenti e la mortalità da patologie cardiovascolari, neurodegenerative e cancro (3). Tra le molecole di origine vegetale che hanno mostrato importanti proprietà biologiche ricordiamo il capsaiato [4-idrossi-3-metossibenzoil(E)-8-metil-6-nonanoato], presente in quantità apprezzabili nei frutti di

una cultivar non piccante di *Capsicum annuum* L., denominata CH-19 Sweet; il capsaiato essendo privo di potere piccante ed irritante, risulta essere interessante dal punto di vista nutrizionale, anche per le proprietà antiossidanti mostrate in diversi modelli sperimentali. Il vanillil nonanoato (Fig. 1), o capsaiato sintetico, viene considerato un composto fenolico in grado di mimare il comportamento dei capsainoidi naturali; per questo motivo in diversi lavori i due composti sono stati messi a confronto e in particolare è stato osservato che il vanillil nonanoato è in grado di esercitare un'attività antiossidante comparabile a quella dell'analogo naturale (4). Il capsaiato è un composto lipofilo, risulta essere insta-

**Figura 1** - Struttura chimica del vanillil nonanoato (VN) e dell'alcol vanillico (VNA)



bile in ambiente acquoso e stabile nei solventi non polari, e *in vivo* è suscettibile all'idrolisi del legame estereo. È stato infatti ipotizzato che le proprietà del vanilloide esercitate *in vivo* possano essere esplicate dall'alcol vanillico (4-idrossi-3-metossibenzil alcol), suo metabolita idrolitico idrofilico (5). In questo lavoro è stato approfondito lo studio sull'attività antiossidante dei vanilloidi in colture cellulari, utilizzando il capsinoide mimico vanillil nonanoato e comparando la sua attività con quella del suo metabolita alcol vanillico, onde valutare le loro proprietà an-

tiossidanti in un sistema biologico più complesso, durante l'ossidazione delle cellule Vero (fibroblasti di rene di scimmia) in presenza di terz-butilidroperossido (TBH), ossidante ampiamente utilizzato per indurre stress ossidativo nelle colture cellulari (6).

### Materiali e metodi

#### *Vanilloidi*

Il vanillil nonanoato (VN) è stato sintetizzato come indicato in letteratura (7). L'alcol vanillico

(VNA) è stato acquistato dalla Sigma-Aldrich, Milano.

#### *Colture cellulari*

È stata utilizzata una linea immortalizzata di fibroblasti di rene di scimmia (cellule Vero) acquistate dalla ECACC (Salisbury, Regno Unito). Le cellule sono state mantenute in un terreno di coltura DMEM contenente il 10% di siero fetale bovino e l'1% di antimicotico-antibiotico penicillina-streptomicina.

Sono state incubate a 37°C in un'atmosfera al 5% di anidride carbonica e coltivate in fiasche da 75 cm<sup>2</sup> ad una densità di 1 x 10<sup>6</sup> cellule/10 ml di terreno di coltura.

#### *Attività citotossica*

La citotossicità del VN e VNA sulle cellule Vero, è stata valutata con il metodo dell'MTT, che consente la misura della vitalità cellulare. Le cellule sono state coltivate in piastre multipozzetto da 24 ad una densità di 10<sup>5</sup> cellule/ml di terreno di coltura completo e sono state incubate per 24 ore con concentrazioni crescenti dei composti (10, 25, 50, 100, 200, 400 e 500 μM in EtOH); un equivalente volume di EtOH è stato aggiunto come controllo alle cellule. Successivamente è stato effettuato il test colorimetrico dell'MTT (8) e il colore sviluppato nel surnatante è

stato determinato spettrofotometricamente a 570 nm. Inoltre la morte cellulare è stata valutata mediante osservazione microscopica.

*Attività antiossidante:  
metodo TBARS*

La capacità antiossidante di VN e VNA è stata preliminarmente valutata come protezione dal danno ossidativo indotto sulle cellule Vero da TBH 750  $\mu\text{M}$ . Le cellule sono state coltivate in fiasche da 25  $\text{cm}^2$  ad una densità di  $2 \times 10^6$  cellule/3 ml di terreno di coltura completo. Dopo 24 ore, il terreno è stato sostituito con 3 ml di PBS e sono state addizionate due concentrazioni (5 e 10  $\mu\text{M}$ ) di VN e VNA o un equivalente volume di EtOH nei campioni di controllo. Dopo 2 ore di incubazione, è stata aggiunta una soluzione acquosa di TBH (750  $\mu\text{M}$ ) e le cellule sono state incubate per altre 2 ore. L'estensione del danno ossidativo è stata valutata come formazione di malonildialdeide (MDA) mediante il metodo TBARS (9).

*Attività antiossidante:  
analisi frazione lipidica*

Le cellule sono state seminate alla concentrazione di  $10^6$  cellule/10 ml di terreno e incubate sino a raggiungere la subconfluenza (circa l'80%). Il terreno è stato quindi

sostituito con PBS e sono stati effettuati i trattamenti con due concentrazioni di VN e VNA (50 e 100  $\mu\text{M}$ ). Un equivalente volume di EtOH è stato addizionato come controllo alle cellule. Dopo 2 ore di incubazione è stato addizionato il TBH (2.5 mM) e dopo 2 ore di trattamento, le cellule sono state staccate con il "cell scraper" e centrifugate; il pellet ottenuto è stato conservato a  $-80^\circ\text{C}$  per le successive analisi della frazione lipidica. Gli acidi grassi sono stati estratti dalle cellule secondo il metodo di Folch et al. (10) lievemente modificato. L'analisi quantitativa e qualitativa degli acidi grassi e dei loro prodotti di ossidazione è stata eseguita in un HPLC 1100 Agilent Technologies con un rivelatore spettrofotometrico a serie di diodi (11).

*Analisi statistica*

È stato utilizzato il programma GraphPAD INSTAT (GraphPAD software, San Diego, CA, USA) per calcolare le medie e le deviazioni standard dei dati ottenuti da tre o quattro esperimenti indipendenti che hanno coinvolto l'analisi in triplo di ciascun campione ( $n = 9$  o  $n = 12$ ). Per evidenziare la significatività tra le medie dei diversi gruppi è stata effettuata l'analisi One way della varianza (ANOVA).

## Risultati

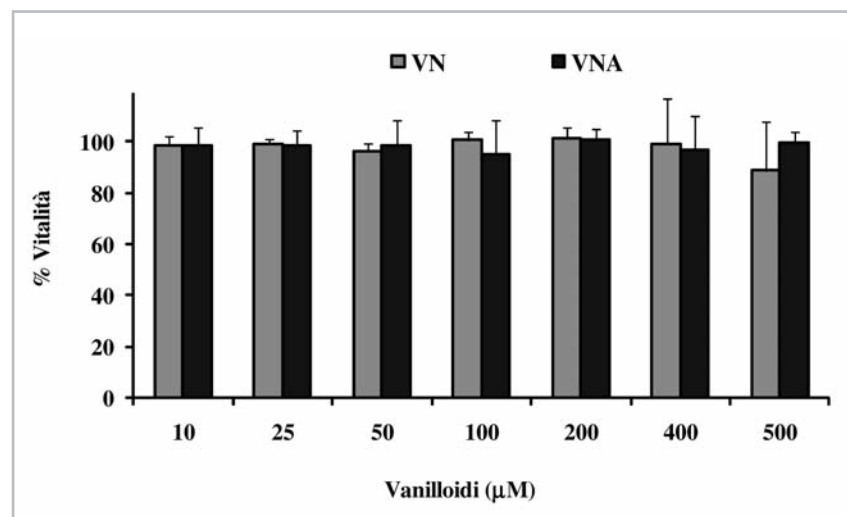
*Attività citotossica*

Il VN e VNA sono stati testati nelle colture cellulari Vero per determinare le concentrazioni non tossiche da utilizzare per lo studio dell'attività antiossidante. In figura 2 è mostrata la percentuale di vitalità cellulare, calcolata rispetto ai controlli, dopo 24 ore di incubazione a  $37^\circ\text{C}$ , in presenza di differenti concentrazioni di VN e VNA (10, 25, 50, 100, 200, 400, 500  $\mu\text{M}$ ). Come si può notare, entrambi i composti non hanno mostrato una significativa attività citotossica alle concentrazioni testate. Infatti la vitalità è risultata di circa il 100% a tutte le concentrazioni utilizzate.

*Attività antiossidante:  
metodo TBARS*

I vanilloidi, VN e VNA, sono stati testati in colture cellulari di Vero per una valutazione dell'attività antiossidante nei confronti del danno indotto dall'agente ossidante TBH. È stata utilizzata la concentrazione 750  $\mu\text{M}$  di TBH, in grado di fornire significativi livelli di ossidazione; l'estensione del danno ossidativo è stata misurata come produzione di MDA e i dati ottenuti sono riportati nella figura 3. L'attività antiossidante dei composti è stata espressa come percen-

**Figura 2** - Percentuale di vitalità, calcolata rispetto ai controlli, delle cellule Vero dopo incubazione, per 24 ore, in presenza di differenti concentrazioni (10-500  $\mu\text{M}$ ) di vanillil nonanoato e alcol vanillico (n = 12)

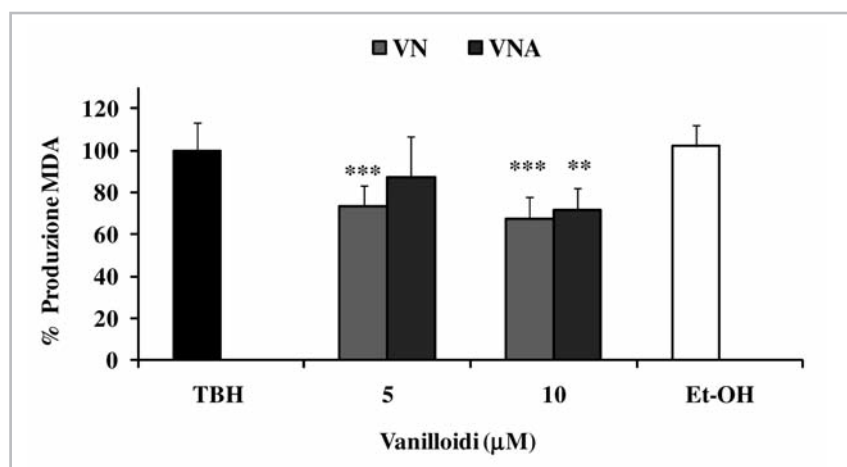


di MDA prodotta). Come si può osservare il VN ha protetto le cellule dal danno ossidativo indotto dal TBH, mostrando una significativa riduzione (30%) della generazione di MDA alla concentrazione 5  $\mu\text{M}$ , mentre VNA ha esplicato una significativa attività antiossidante alla concentrazione di 10  $\mu\text{M}$ . La capacità antiossidante delle molecole non è risultata correlata alla presenza di EtOH.

*Attività antiossidante:  
analisi frazione lipidica*

L'attività antiossidante del VN è stata comparata a quella del suo metabolita idrolitico idrofilico VNA, nelle cellule Vero per valutare l'effetto protettivo contro l'ossidazione indotta da una dose più elevata, non citotossica, di TBH (2.5 mM) dei lipidi di membrana. Dalle cellule sono stati estratti i lipidi ed è stato analizzato il consumo dei principali acidi grassi e la formazione dei principali e più stabili prodotti di ossidazione, gli idroperossidi degli acidi grassi a dieni coniugati (HP). Nella figura 4 sono riportati i valori della somma dei principali acidi grassi polinsaturi (PUFA) (acido linoleico 18:2, acido arachidonico 20:4, acido eicosapentaenoico 20:5 n-3, acido docosapentaenoico 22:5 n-3, e acido docosaesanoico 22:6 n-3) e degli HP

**Figura 3** - Percentuale di produzione di MDA indotta da TBH 750  $\mu\text{M}$  in presenza di vanillil nonanoato e alcol vanillico (5 e 10  $\mu\text{M}$ ), calcolata rispetto ai controlli senza TBH (0% di MDA prodotta). È inoltre mostrato il campione di controllo contenente EtOH. \*\*\*= p< 0.001; \*\*= p< 0.01 rispetto ai controlli. (n = 12)



tuale di formazione di MDA in assenza (campioni con TBH, 100% di produzione di MDA) o

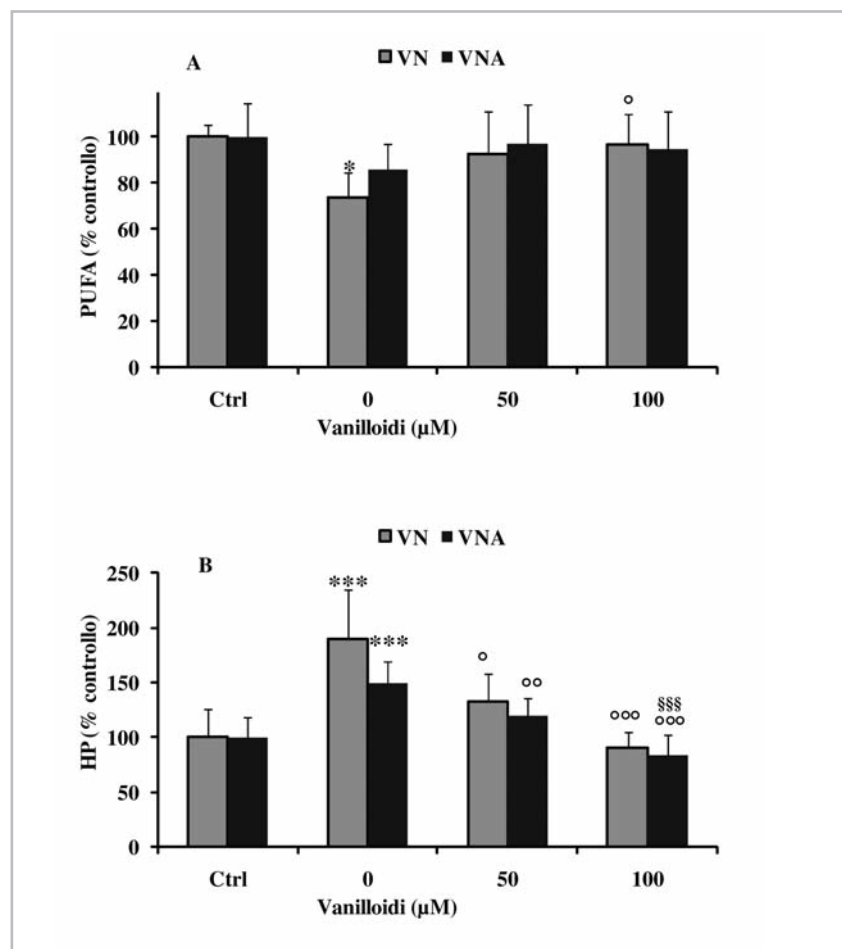
in presenza dell'antiossidante, confrontata con i controlli non sottoposti all'azione del TBH (0%

rispettivamente, misurati nei campioni di cellule di controllo (Ctrl) e nei campioni ossidati per 2 ore con TBH 2.5 mM in assenza (0) o in presenza di VN e VNA (50 e 100  $\mu\text{M}$ ) espressi in percentuale rispetto ai controlli. Nei campioni ossidati con il TBH (0) si è osservata una riduzione dei PUFA totali (Fig. 4A), e un incremento degli HP (Fig. 4B), risultati significativi rispetto ai controlli. Il pretrattamento delle cellule Vero con i vanilloidi ha esercitato una protezione dal danno ossidativo indotto dal TBH nei confronti dei PUFA totali (Fig. 4A) e in particolare il VN ha inibito in maniera significativa il consumo dei PUFA alla concentrazione di 100  $\mu\text{M}$ . L'attività antiossidante dei composti è risultata anche ben evidente sull'incremento degli HP, indotto dal trattamento per 2 ore con il TBH; nelle cellule pretrattate con VN e VNA (50 e 100  $\mu\text{M}$ ) è stata infatti osservata una significativa riduzione degli HP rispetto ai campioni ossidati, con un valore simile alle cellule di controllo. L'attività antiossidante esercitata dai composti è risultata inoltre dipendente dalla concentrazione utilizzata.

## Discussione

Il frutto del *Capsicum annuum* è una buona fonte di antiossidanti

**Figura 4** - Valori della somma dei principali acidi grassi poliinsaturi (PUFA) (18:2, 20:4, 20:5 n-3, 22:5 n-3, e 22:6 n-3) (A) e degli idroperossidi (HP) (B), misurati nelle cellule Vero di controllo (Ctrl) e nei campioni ossidati con TBH 2.5 mM per 2 ore, in assenza (0) o in presenza di vanillil nonanoato e alcol vanillico (50 e 100  $\mu\text{M}$ ), espressi in percentuale rispetto ai controlli. \*\*\*=  $p < 0.001$ ; \*=  $p < 0.05$  rispetto ai controlli; °°°=  $p < 0.001$ ; °°=  $p < 0.01$ ; °=  $p < 0.05$  rispetto ai campioni ossidati con TBH; \$\$\$=  $p < 0.001$  rispetto ai campioni pretrattati con alcol vanillico 50  $\mu\text{M}$  (n = 9).



naturali e tra questi vi sono i capsinoidi, presenti in maggiore quantità nei frutti di una cultivar non piccante chiamata CH-19 Sweet. Il capsinato, principale capsinoido presente nel *Capsicum*, ha mostrato diverse attività biologiche (12), in particolare una notevole attività antiossidante *in vitro*. Il VN è considerato un composto fenolico in grado di mimare il

comportamento dei capsinoidi naturali e ha mostrato un'attività antiossidante comparabile a quella dell'analogo naturale (4).

In questo lavoro è stato approfondito lo studio dell'attività antiossidante del VN in un modello di stress ossidativo in colture cellulari, per valutare la capacità della molecola di contrastare la degradazione ossidativa dei lipidi cellu-



lari di membrana, comparando la sua attività con quella dell'VNA, suo metabolita idrolitico idrofilico. In questo lavoro è stato osservato che il pretrattamento con VN o VNA è in grado di preservare le cellule Vero dal danno ossidativo indotto da TBH. I due vanilloidi hanno mostrato una notevole attività antiossidante, mostrando un evidente effetto protettivo sulla riduzione dei livelli di PUFA, inibendo l'aumento di MDA e di HP. In uno studio precedente è stato visto che entrambi i composti sono in grado di proteggere dal processo ossidativo causato dai radicali liberi *in vitro*, e in particolare il VN è risultato in grado di inibire il danno ossidativo acuto indotto da radicali idrossilici prodotti *in vivo* per accumulo di ferro; in questo lavoro è stato ipotizzato che l'attività antiossidante dal VN possa essere mediata dall'VNA e che la porzione vanilloide giochi un ruolo chiave nell'azione antiossidante esplicita *in vivo* (13). Di conseguenza, i capsinoidi naturali e l'analogo sintetico possono funzionare *in vivo* come pro-drug dell'alcol vanillico. Recentemente in una serie di studi effettuati per valutare la tossicità e la farmacocinetica dei capsinoidi nei ratti e nell'uomo, è stato dimostrato che i composti, in seguito a somministrazione orale, subiscono l'idrolisi del legame estere nel tratto gastri-

co portando alla formazione di VNA; successivamente il metabolita verrebbe poi assorbito dalla mucosa intestinale e introdotto nel circolo sanguigno (14). In futuro sarà interessante approfondire i processi correlati all'assorbimento e alla biodisponibilità dei vanilloidi in particolare del VNA, utilizzando le colture cellulari, che rappresentano un passaggio importante nello studio della biodisponibilità dei composti e dei loro metaboliti, per avere utili informazioni sulle attività biologiche esplicitate *in vivo*.

### Bibliografia

- Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *BJP* 2004; 142: 231-55.
- Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2005; 15: 316-28.
- Ratnam DV, Ankola DD, Bhardwaj V, Sahana DK, Kumar MN. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *J Control Release* 2006; 113: 189-207.
- Rosa A, Deiana M, Casu V, Paccagnini S, Appendino G, Ballero M, Dessi M A. Antioxidant activity of capsinoids. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 7396-401.
- Iida T, Moriyama T, Kobata K, et al. TRPV1 activation and induction of nociceptive response by a non-pungent capsaicin-like compound, capsiate. *Neuropharmacology* 2003; 44: 958-67.
- Goya L, Mateos R, Bravo L. Effect of the olive oil phenol hydroxytyrosol on human hepatoma HepG2 cells: Protection against oxidative stress induced by tert-butylhydroperoxide. *Eur J Nutr* 2007; 46: 70-8.
- Appendino G, Minassi A, Daddario N, Bianchi F, Tron GC. Chemoselective esterification of phenolic acids and alcohols. *Org Lett* 2002; 4: 3839-41.
- Schiller CD, Kainz A, Mynett K, Gescher A. Assessment of viability of hepatocytes in suspension using the MTT assay. *Toxicol In vitro* 1992; 6: 575-8.
- Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978; 52: 302-10.
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 1957; 226: 497-509.
- Rosa A, Deiana M, Atzeri A, et al. Evaluation of the antioxidant and cytotoxic activity of arzanol, a prenylated  $\alpha$ -pyrone-phloroglucinol etherodimer from *Helichrysum italicum* subsp. *Microphyllum*. *Chem Biol Interact* 2007; 165: 117-26.
- Sasahara I, Furuhashi Y, Iwasaki Y, et al. Assessment of the biological similarity of three capsaicin analogs (Capsinoids) found in non-pungent chili pepper (CH-19 Sweet) fruits. *Biosci Biotechnol Biochem* 2010; 74 (2): 274-8.
- Rosa A, Deiana M, Corona G, et al. Protective effect of capsinoid on lipid peroxidation in rat tissues induced by Fe-NTA. *Free Radic Res* 2005; 39 (11): 1155-62.
- Shirai Y, Ueno S, Nakayama A, et al. Studies of the toxicological potential of capsinoids, XII: pharmacokinetic study of capsinoid-containing CH-19 Sweet extract in rats. *Int J Toxicol* 2010; 29 (2 Suppl): 15S-21S.