



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO

DIPARTIMENTO PER LA INNOVAZIONE NEI SISTEMI BIOLOGICI, AGROALIMENTARI E
FORESTALI (DIBAF)

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PERUGIA

DIPARTIMENTO DI SPECIALITA' MEDICO-CHIRURGICHE E SANITA' PUBBLICA
(DISPEMEC)

Sez. di Epidemiologia Molecolare e Igiene Ambientale

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA

IN SCIENZE AMBIENTALI - XXIII Ciclo

TITOLO TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

MECCANISMI CHEMIOPREVENTIVI DEI FENOLI DELL'OLIO D' OLIVA NEI
CONFRONTI DEL DANNO CELLULARE INDOTTO DA XENOBIOTICI AMBIENTALI

sigla del settore scientifico-disciplinare

(MED/42)

Coordinatore: Prof. Maurizio Petruccioli

Firma

Tutor: Prof. Roberto Fabiani

Firma.....

Dottoranda: Raffaella Fuccelli

Firma

Anno accademico 2011/2012

SOMMARIO

INTRODUZIONE	5
1. DIETA MEDITERRANEA E OLIO D' OLIVA.....	7
1.1 Classificazione e Composizione dell'olio di Oliva.....	7
1.2 Estrazione dell'olio dalle Olive	9
1.3 Importanza dell'olio nell'Alimentazione Umana	12
2. LE ACQUE DI VEGETAZIONE.....	14
2.1 Composizione	14
2.2 Smaltimento, Impatto Ambientale e Normativa.....	15
2.3 Importanza Commerciale ed Economica dei Prodotti a Base di Estratti di Acque di Vegetazione (WW)	19
3. POLIFENOLI E CANCEROGENESI	20
3.1 Effetto Protettivo dei Polifenoli Naturali	22
3.2 Effetto protettivo dei Polifenoli dell'olio di Oliva.....	23
4. METABOLITI DEI COMPOSTI ORGANICI VOLATILI (COV) E CANCEROGENESI	25
4.1 1,3-Butadiene.....	29
4.2 Stirene	30
5. SCOPO DEL LAVORO	34
6. MATERIALI E METODI	36
6.1 Materiali e Linee Cellulari.....	36
6.2 Preparazione degli Estratti Polifenolici.....	37
6.3 Trattamenti Cellulari	38
6.4 Isolamento delle Cellule Mononucleate da Sangue Periferico.....	40
6.5 Valutazione della Proliferazione	41
6.5.1 Metodo del Trypan Blue	41
6.5.2 Test Colorimetrico dell'MTT [Bromuro di 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolio]	41

6.6 Valutazione dell'Apoptosi	43
6.6.1 Microscopia a Fluorescenza	43
6.6.2 Analisi del Picco Sub G1	44
6.6.3 Saggio dell'Annessina V.....	44
6.7 Comet Assay (Elettroforesi di singole cellule su gel).....	45
6.7.1 Comet Assay Tradizionale.....	45
6.7.2 Comet Assay Modificato	45
6.7.3 Rilevazione delle Comete e Analisi Statistica.....	46
6.8 Valutazione dei Perossidi Intracellulari mediante il Test della Di-Cloro-Fluoresceina Di-Acetato (DCFH-DA).....	48
6.9 Dosaggio della Concentrazione di Perossido di Idrogeno (H ₂ O ₂) nei Terreni di Coltura.....	48
6.10 Metodica del Western Blotting	49
7. RISULTATI	50
7.1 Effetti degli Epossidi dei COV e dei Composti Fenolici sulla Iniziazione Tumorale	50
7.1.1 Prevenzione del danno al DNA indotto dal perossido di idrogeno (H ₂ O ₂) da parte dei composti fenolici.....	50
7.1.2 Induzione del danno al DNA da parte degli epossidi dei COV	55
7.1.3 Prevenzione del danno al DNA indotto dagli epossidi dei COV da parte dei composti fenolici	60
7.2 Valutazione dell'effettoAnti-promozione/Progressione Tumorale dell'Idrossitiroso	70
7.2.1 Inibizione da parte della NAC dell'effetto anti-proliferativo e pro-apoptotico dell'idrossitiroso (3,4-DHPEA)	70
7.2.2 Effetto di Noti Antiossidanti Naturali sull'Apoptosi indotta dal 3,4-DHPEA	73
7.2.3 Coinvolgimento di H ₂ O ₂ nell'Apoptosi indotta dal 3,4-DHPEA.....	74
7.2.4 Inibizione del Ciclo Cellulare da parte del 3,4-DHPEA: Inibizione della Fosforilazione di Rb	84
8. DISCUSSIONE	86

8.1 Valutazione degli Effetti sulla Iniziazione Tumorale degli Epossidi dei COV e dei Composti Fenolici	86
8.2 Valutazione dell'Effetto Anti-Promozione/Progressione Tumorale dell'idrossitiroso.....	91
9. CONCLUSIONI.....	94
BIBLIOGRAFIA	96

INTRODUZIONE

L'esposizione quotidiana a sostanze tossiche e cancerogene presenti nei diversi comparti ambientali quali aria, acqua e suolo, e in alimenti di diversa origine, possono influenzare la comparsa di patologie cronico degenerative, in particolare i tumori in diverse sedi, la cui incidenza è fortemente aumentata negli ultimi decenni. Per quanto riguarda gli alimenti va osservato che, non solo la loro contaminazione legata all'inquinamento ambientale o a certe pratiche agronomiche, ma anche l'uso esagerato di certi alimenti nella così detta dieta occidentale, può essere fattore di rischio per malattie cronico degenerative. Va però osservato che alcuni alimenti soprattutto di origine vegetale, che sono alla base della dieta mediterranea, sono in grado di prevenire le suddette patologie ed in particolare i tumori di diverse sedi come dimostrato non solo da numerose ricerche epidemiologiche [1-3], ma anche da studi di laboratorio condotti sia "in vitro" [4-7] che sul modello animale [8,9]. Infatti questi ultimi studi hanno evidenziato che numerose molecole di origine vegetale possiedono potenti attività antiossidanti che possono essere coinvolte nella prevenzione dei tumori, agendo sulle differenti fasi del processo di cancerogenesi. In tale contesto una classe di composti che ha ricevuto particolare attenzione è quella dei polifenoli presenti nell'olio di oliva, alimento tipico della dieta mediterranea. I polifenoli dell'olio di oliva hanno dimostrato di possedere infatti un ampio spettro di attività biologiche, come riportato in numerosi lavori che hanno chiaramente evidenziato i loro effetti benefici sulla salute [1-9], suggerendo un loro promettente ruolo quali molecole in grado di prevenire patologie-cronico degenerative compresi i tumori, agendo nelle diverse fasi del processo multistadio della cancerogenesi indotto anche da xenobiotici di origine ambientale [10,11]. Tale aspetto può avere importanti implicazioni nell'evitare danni legati ad esposizioni pregresse agli inquinanti presenti nei diversi comparti ambientali. Una classe di inquinanti atmosferici ubiquitari sia in ambienti indoor che outdoor, è costituita dai Composti Organici Volatili (COV) che insieme al particolato atmosferico sono da considerare la frazione avente maggior impatto sulla salute umana. Tali composti infatti, come del resto altri xenobiotici, una volta penetrati nell'organismo vengono trasformati chimicamente da enzimi specifici (enzimi di fase I e II), che li metabolizzano attivandoli. Tuttavia questa attivazione può avere sia un effetto protettivo, (eliminazione e/o detossificazione), che un effetto

dannoso con conseguente formazione di metaboliti altamente reattivi in grado di reagire con le macromolecole biologiche, proteine, lipidi e DNA, provocando alterazioni della loro struttura e riduzione o perdita della funzionalità [12,13]. L'effetto cancerogeno dei COV sembra appunto essere dovuto alla formazione di uno o più metaboliti reattivi in grado di agire da agenti alchilanti formando addotti alle basi azotate del DNA [14,15]. Come si evince da dati della letteratura, una via alternativa sembra poter essere la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) responsabili del danno ossidativo al DNA come dimostrato ad esempio per lo stirene ossido, metabolita dello stirene [16]. Dato che il meccanismo di genotossicità ed il relativo potenziale cancerogeno dei differenti composti sopra riportati non è ancora completamente chiarito, lo studio degli effetti dei differenti epossidi sul danno al DNA si rende necessario, per arricchire i dati incompleti sulla loro potenziale attività genotossica. Come spesso riportato infatti i ROS sono prodotti non solo da processi endogeni ma anche dall'esposizione ad agenti esogeni, quali inquinanti, radiazioni e microorganismi coinvolti nei processi infiammatori.

L'iperproduzione dei ROS, non controbilanciata da una adeguata attività antiossidante, è responsabile della senescenza e dell'apoptosi delle cellule e, come ultimo stadio, di tumori e di altre malattie degenerative correlate con l'invecchiamento [4].

Poiché i fenoli dell'olio di oliva, come precedentemente riportato, possiedono un forte potere antiossidante, potrebbero essere in grado di impedire la produzione di ROS evitando il danno ossidativo al DNA e inibendo la fase di iniziazione del processo di cancerogenesi.

Sulla base delle considerazioni riportate, in questo lavoro di tesi si sono analizzate alcune attività chemio-preventive dei polifenoli estratti dall'olio di oliva e dalle acque di risulta della lavorazione delle olive (acque di vegetazione), cercando di evidenziare la loro capacità di controbilanciare l'azione dei ROS prodotti dagli epossidi dei COV e quindi di evitare o ridurre il danno al DNA indotto da cancerogeni ambientali.

1. DIETA MEDITERRANEA E OLIO D' OLIVA

La dieta mediterranea è uno stile alimentare che privilegia il consumo di frutta, verdura, patate, legumi, pasta, pane e pesce. Tipico di questo regime alimentare, è l'olio extra-vergine d'oliva, eccezionale per il suo gusto e per la sua digeribilità e soprattutto perché, per la sua composizione in acidi grassi, principalmente l'acido oleico, risulta importante nella prevenzione di patologie cardiovascolari. Infatti, sono ormai note le proprietà antiossidanti dell'olio d'oliva che si realizzano nella “lotta” contro i radicali liberi e nella capacità di ridurre i livelli delle LDL ossidate (lipoproteine a bassa densità,) e di aumentare quelli delle HDL (lipoproteine ad alta densità, definite come “colesterolo buono”) [1,6].

Negli ultimi anni, l'attenzione del mondo scientifico è stata rivolta alla componente fenolica dell'olio, la quale ha manifestato, in ormai numerosi lavori scientifici, di avere un forte potere antiossidante e di prevenire la cancerogenesi grazie alla sua capacità di inibire, “in vitro”, il danno genotossico provocato dai ROS, la proliferazione di cellule tumorali, di bloccare il ciclo cellulare e di indurre l'apoptosi [7].

1.1 CLASSIFICAZIONE E COMPOSIZIONE DELL'OLIO DI OLIVA

L'olio di oliva è un alimento tipico dell'area mediterranea e si ottiene dalla spremitura dei frutti dell'*Olea europae*. Il frutto è costituito da una drupa le cui dimensioni e forma variano a seconda della cultivar e delle condizioni di coltura; in essa si distinguono all'esterno l'epicarpo o buccia sottile ed elastico, il mesocarpo o polpa di consistenza carnosa, l'endocarpo o nocciolo di consistenza legnosa che racchiude il seme.

Secondo il regolamento dell'UE 1513/2001, si definiscono oli di oliva vergini gli “oli ottenuti dall'oliva mediante processi meccanici o altri processi fisici, in condizioni che non causino alterazioni dell'olio, e che non hanno subito nessun trattamento diverso dal lavaggio, dalla decantazione, dalla centrifugazione e dalla filtrazione”. Questi oli sono classificati in:

- ✓ *Olio extra vergine di oliva* cioè l'olio di oliva vergine la cui acidità libera, espressa in acido oleico, è al massimo 0,8 g per 100g;
- ✓ *Olio di oliva vergine* cioè l'olio di oliva vergine la cui acidità libera, espressa in acido oleico, è al massimo 2 g per 100 g;
- ✓ *Olio di oliva vergine lampante* cioè olio di oliva vergine la cui acidità libera, espressa in acido oleico, è superiore a 2 g per 100 g.

In generale, l'olio di oliva è costituito per il 98-99% da una miscela di triacilgliceroli e minime quantità di diacilgliceroli e monoacilgliceroli che costituiscono la *frazione "saponificabile"* e per il rimanente 1-2% da un insieme di composti minori che costituiscono *"l'insaponificabile"*.

Il triacilglicerolo predominante è la trioleina alla quale seguono palmitildioleina, dioleilinoileina, palmitiloleilinoileina, stearildioleina e la dipalmitilmonooleina.

Per quanto riguarda la composizione in acidi grassi, quello maggiormente presente è l'acido oleico (C18:1); gli acidi grassi polinsaturi essenziali, quali linoleico e linolenico (C18:2) (C18:3), sono presenti ma non in quantità elevata.

Sembra che gli acidi grassi siano responsabili delle caratteristiche organolettiche dell'olio, infatti, si è visto che un buon indice di qualità è presente in quegli oli che possiedono un tenore di acido oleico non al di sotto del 73% e quello di linoleico non superiore al 10%; mentre il rapporto oleico: linoleico non dovrebbe essere inferiore a 7.

Per quanto riguarda i digliceridi, questi possono presentarsi in forma 1,2 o 1,3, in relazione a quali atomi sono esterificati; la predominanza di 1,2 digliceridi, derivando da incompleta biosintesi dei triacilgliceroli, è in relazione alla freschezza dell'olio che li contiene.

L'insieme dei composti minori che costituiscono la frazione insaponificabile è rappresentato da: idrocarburi, il cui maggior rappresentante è lo squalene, un terpene a sei unità isopreniche che, in quanto antiossidante incide sulle proprietà nutrizionali dell'olio; alcoli alifatici tra cui l'esacosanolo, l'ottacosanolo e il tetracosanolo; alcoli terpenici, steroli in cui predomina il β -sitosterolo, anch'essi antiossidanti naturali; tocoferoli presenti in forme diverse quali α -tocoferoli come ad esempio la vitamina E, β -tocoferoli e γ -tocoferoli che essendo antiossidanti naturali

inibiscono l'irrancidimento ossidativo del prodotto e proteggono dalla perossidazione dei grassi mediante l'interazione con l'ossigeno e i radicali liberi; pigmenti come carotenoidi quali neoxantina, xantofille, luteoxantina, β -carotene e luteina, e clorofille quali clorofilla a, b, feofitina a e b, che danno il colore all'olio e composti fenolici [17].

Questi ultimi composti sono sostanze derivate dagli idrocarburi aromatici per sostituzione di uno o più atomi di idrogeno con gruppi -OH. Possono essere classificati in fenil-acidi e fenil-alcoli, che costituiscono la frazione semplice, in flavonoidi, secoiridoidi e lignani che costituiscono la frazione complessa o idrolizzabile. Questi composti si originano durante il processo di estrazione meccanica dai polifenoli glucosidici presenti nell'oliva [18,19]. Alla classe dei fenil-acidi appartengono l'acido caffeico, vanillico, siringico, *p*-cumarico, *o*-cumarico, protocatechico, sinapico e *p*-idrossibenzoico e sono storicamente i primi composti fenolici ritrovati nell'olio vergine di oliva [20]. Questi composti sono presenti in minime quantità nell'olio vergine di oliva, dove invece prevalgono i secoiridoidi.

Tra questi i più abbondanti sono: la forma dialdeica dell'acido elenolico legata all'idrossitirosolo o tirosolo, ligstroside aglicone, oleuropeina e i suoi agliconi [18].

Per quanto riguarda invece i fenil-alcoli, quelli che sono presenti nell'olio vergine di oliva sono: idrossitirosolo (3,4-DHPEA) ed il tirosolo (p-HPEA) le cui concentrazioni sono basse nell'olio appena estratto e tendono ad aumentare durante il loro stoccaggio [21].

Sono stati inoltre identificati i lignani, che sono: (+)-1-acetossipinoresinolo, (+)-1-pinoresinolo, (+)-1-idrossipinoresinolo che oltre ad essere agenti antiossidanti, svolgono un ruolo protettivo nei confronti del tumore al seno, colon e prostata [22].

1.2 ESTRAZIONE DELL'OLIO DALLE OLIVE

Il processo di estrazione dell'olio utilizza diverse tecnologie di estrazione, tra le quali le più diffuse sono la pressione, la centrifugazione, ed il percolamento; qualunque di queste tecniche venga usata, esistono una serie di operazioni preliminari che in ogni caso si devono compiere. Queste sono: la defogliazione e il lavaggio, la frangitura e la gramolazione.

La defogliazione e il lavaggio si rendono necessari in quanto le olive possono giungere in frantoio insieme a corpi estranei solidi di origine vegetale o minerale che possono danneggiare gli impianti; pertanto vengono utilizzate delle macchine automatiche provviste di un sistema di aspirazione e di una vasca a circolazione forzata dell'acqua per il lavaggio delle olive. La frangitura è l'operazione che ha lo scopo di rompere le cellule della polpa e determinare la fuoriuscita dell'olio dai vacuoli, con formazione di gocce di maggiori dimensioni; il prodotto che si ottiene da questa fase è la pasta d'olio composta da olio, acqua e parti solide. In questa fase si può avere il surriscaldamento della pasta e possono avere luogo modificazioni dell'olio stesso a causa del contatto delle goccioline di olio con gli enzimi liberati dalla degradazione delle compartimentazioni cellulari. La frangitura può avvenire attraverso il metodo tradizionale che utilizza il frantoio a molazze, oppure attraverso il frangitore metallico. Il frantoio a molazze è costituito da una vasca di materiale metallico in cui vengono ricevute le olive, da molazze verticali di granito a forma cilindrica (due o tre) che schiacciano il frutto con parziale snocciolamento e rimescolano la pasta, da palette rimescolatrici che riportano la pasta continuamente sotto le molazze, da una pala d'espulsione della pasta dal bacino e da organi di movimento. I frangitori metallici sono costituiti invece da un organo metallico ruotante che schiaccia le olive contro una superficie metallica fissa, provvista di fori; tali frangitori hanno il vantaggio di rendere continua l'operazione di molitura delle olive, di avere elevata capacità oraria e di essere meno ingombranti e costosi rispetto al frantoio a molazze. Dopo la frangitura si procede alla gramolazione, condotta in apposite gramolatrici, che ha lo scopo di "riunire" le goccioline di olio in gocce più grandi tali da potersi separare in fase liquida continua e di rompere l'emulsione olio/acqua che si forma in frangitura. Il punto critico di questa fase è quello di ottimizzare il binomio tempo-temperatura per ottenere una migliore combinazione resa-contenuto in fenoli. Essa rappresenta una fase importante per le caratteristiche dell'olio per il verificarsi di modificazioni indesiderabili ad opera di enzimi quali le lipasi, con aumento dell'acidità, ma anche desiderabili per le caratteristiche organolettiche, quali la "cascata delle lipossigenasi" che catalizza la formazione di idroperossidi che vengono idrolizzati dall'idroperossido liasi con formazione di aldeidi che oltre a dare esse stesse un importante contributo all'aroma dell'olio, vengono ridotte ad alcoli, anch'essi importanti nel definire l'aroma. Compiute queste operazioni, si procede

all'estrazione vera e propria con l'ottenimento di tre prodotti finali: *olio, acqua di vegetazione e sansa*.

L'estrazione avviene attraverso diverse tecniche.

L'estrazione per pressione si realizza con un sistema premente costituito da una pressa idraulica che agisce su una torre formata sovrapponendo diaframmi filtranti, chiamati "fiscoli" i quali vengono impilati su apposito carrello dotato di guida centrale. Il sistema per centrifugazione realizza invece, la separazione delle fasi liquide e di quella solida sfruttando la differenza tra i pesi specifici dei liquidi immiscibili e del materiale solido, esaltata dalla forza centrifuga. La centrifuga orizzontale (decanter), è costituita da un tamburo cilindrico-conico: una leggera differenza tra la velocità di rotazione del tamburo e della vite interna (più veloce) permette la separazione della sansa verso un'estremità della centrifuga, mentre l'olio e l'acqua si separano dall'altra estremità. Il sistema per percolamento sfrutta la differenza di tensione superficiale tra olio e acqua: immergendo una lamina di acciaio nella pasta delle olive, essa si bagna preferenzialmente di olio in quanto la tensione interfacciale dell'olio è inferiore rispetto a quella dell'acqua [17-19].

1.3 IMPORTANZA DELL'OLIO NELL'ALIMENTAZIONE UMANA

Per la sua composizione, l'olio di oliva costituisce l'alimento principe della dieta mediterranea. E' usato come condimento ma può essere usato anche per cucinare grazie all'alto punto di fumo (210 °C per l'olio extra vergine), pertanto più stabile all'azione del calore producendo pochi perossidi e polimeri rispetto ad altri oli, in particolare si produce pochissima acroleina (prodotto di degradazione del glicerolo, volatile, irritante per la mucosa gastrica); questo fa sì che sia ottimo per le frittute.

Numerose evidenze supportano l'ipotesi che le proprietà salutistiche della dieta mediterranea e la sua abilità nel ridurre l'incidenza di alcune malattie degenerative, incluse le malattie cardio-vascolari e il cancro, potrebbero essere attribuite, almeno in parte all'olio extra vergine di oliva [2].

In particolare, studi epidemiologici pubblicati recentemente hanno dimostrato una chiara associazione tra il consumo di olio di oliva e un ridotto rischio di sviluppare il cancro in differenti organi, quali mammella [23,24], prostata [25], polmone [26], laringe [27], ovaie [28] e colon [29]. Inoltre studi condotti in animali in accordo con queste osservazioni, hanno evidenziato che l'olio di oliva potrebbe prevenire lo sviluppo del carcinoma del colon, indotti dall'azossimetano [30] e ridurre l'incidenza del tumore mammario nei ratti provocato dal dimetilbenz(a)antracene [31]. E' stato inoltre dimostrato che l'olio di oliva è in grado di sopprimere spontaneamente il processo di cancerogenesi nel fegato di topo [32] e ridurre la cancerogenesi della pelle quando applicato in maniera topica sia prima che dopo l'esposizione del topo ai raggi UV [33]. Inoltre l'olio di oliva riduce la pressione arteriosa, riduce il tasso di zuccheri nel sangue, aumenta la secrezione di bile contribuendo a ridurre il rischio di formazione di sali biliari e l'eccesso di colesterolo nel sangue, aumenta l'assorbimento di vitamina E con conseguente assorbimento del calcio, previene l'aterosclerosi [34]. L'olio extra vergine di oliva inoltre, è indicato per l'alimentazione nell'infanzia perché la composizione in acidi grassi è simile a quella del latte materno: ciò vale sia per gli acidi grassi essenziali, acido linoleico e linolenico, che per l'acido oleico che aiuta l'accrescimento delle ossa lunghe e la mielinizzazione delle fibre nervose del neonato [34].

Sebbene gli studi sopra riportati indichino chiaramente un'attività protettiva dell'olio vergine di oliva, i componenti responsabili di questi effetti ed il loro meccanismo di azione rimane largamente sconosciuto.

Le sue proprietà benefiche sono da attribuire in parte alla presenza di acido oleico che riduce i livelli di LDL senza incidere sulla percentuale di colesterolo-HDL, e che rende l'olio particolarmente digeribile.

Inoltre anche la componente fenolica sembra inibire l'ossidazione delle LDL attraverso un'attività antiossidante nei confronti dei radicali liberi [13]. Le LDL sono lipoproteine a bassa densità implicate nel metabolismo lipidico, trasportatrici di triacilgliceroli e fosfolipidi (20-30%), proteine (25%) e per la maggior parte di colesterolo prevalentemente esterificato (40%). La loro funzione è quella di trasportare il colesterolo ai tessuti che lo richiedono per la sintesi di varie sostanze, quali gli ormoni sessuali da parte delle gonadi e ormoni corticosteroidi da parte della corteccia surrenale [14]. Le LDL sono quelle che maggiormente predispongono alle malattie cardiovascolari: dannosa è infatti l'ossidazione delle LDL in eccesso nel sangue. Le LDL ossidate che si formano vengono captate da cellule specializzate del sistema immunitario, i macrofagi, che le inglobano, formando le cellule schiumose. Infatti i macrofagi possiedono dei recettori specifici per LDL ossidate. Queste cellule restano intrappolate nelle pareti dei vasi sanguigni e contribuiscono alla formazione delle placche ateromatose, che restringono il lume delle arterie provocando ictus cerebrali o infarti [35].

In definitiva quindi, i polifenoli, inibendo l'ossidazione delle LDL e agendo da scavenger dei radicali liberi, svolgono un'azione di protezione dalla patologie cardiovascolari [36].

Infine, molto importante è l'azione antiossidante degli acidi grassi polinsaturi sui processi d'invecchiamento cellulare e di degenerazione cerebrale e l'azione remineralizzante dell'acido oleico con benefici nei confronti dell'osteoporosi, frequente negli anziani [37].

2.LE ACQUE DI VEGETAZIONE

Le acque di vegetazione (WW) derivano dalla lavorazione dell'olio di oliva e sono il risultato del miscuglio dell'acqua di costituzione della drupa, dell'acqua di lavaggio delle macchine e dell'acqua di diluizione della pasta delle olive. Se ne producono, nelle migliori condizioni di molitura, un metro cubo per una tonnellata di olive molite. Comunque la quantità di WW è variabile a seconda della tecnica usata per l'estrazione dell'olio: infatti, usando il sistema tradizionale, a pressione discontinuo, si ottiene una quantità limitata di acqua rappresentata dall'acqua di lavaggio delle olive (5% del peso delle olive lavorate), dall'acqua di lavaggio degli impianti (5-10%) e dall'acqua propria delle olive che costituisce circa il 40-50% [38].

Usando invece tecniche più recenti, quali il sistema a centrifugazione o continuo, la quantità di WW si aggira intorno all'80-110% poiché tale sistema necessita di una quantità maggiore di acqua per fluidificare la pasta in fase di estrazione per agevolare la fuoriuscita dell'olio [39].

Le WW si presentano come un liquido di colore scuro, con un odore intenso di olio, con un pH acido, compreso tra 5 e 5,5, con un'alta conducibilità elettrica e sono facilmente fermentabili.

2.1 COMPOSIZIONE

Per la loro composizione, le WW sono considerate fonte di inquinamento.

Nonostante questa sia fortemente influenzata dal tipo di olive, dal loro grado di maturazione, dal tempo di stoccaggio, dalle metodiche usate per l'estrazione dell'olio dalla materia prima, le WW presentano comunque una componente organica e una componente inorganica.

La prima, è quella che incide maggiormente sul carico inquinante, il quale viene espresso come COD (domanda chimica di ossigeno) e BOD (domanda biologica di ossigeno) i cui valori massimi raggiungono rispettivamente i 200 e 100 mg/l [40].

Il COD rappresenta il consumo totale di ossigeno, espresso in mg/l, necessario per ossidare completamente le sostanze organiche ed inorganiche del campione analizzato. Si ottiene dopo ebollizione dell' acqua di vegetazione per due ore con una determinata quantità di bicromato di potassio in ambiente acido e in presenza di solfato di argento; il BOD invece esprime indirettamente il carico di sostanze organiche degradabili biologicamente attraverso la misura dell'ossigeno richiesto per la sua bioossidazione. Tale valore viene ottenuto attraverso il confronto tra BOD₀ e il BOD₅: il primo si riferisce alla quantità di ossigeno registrata al momento dell'incubazione a 20°C al buio del campione esaminato in presenza di microrganismi aerobici di ceppi selezionati, e il secondo fa riferimento alla quantità di ossigeno registrata a cinque giorni dall'incubazione.

Il potere inquinante della frazione organica è dovuto principalmente alla presenza dei composti polifenolici, quali idrossitirosolo (derivante dall'idrolisi dell'oleuropeina), che è quello presente in quantità maggiore, tirosolo, verbascoside, acido paracumarico, vanillico, protocatechico, caffeico [41].

Sono presenti in quantità importanti anche gli zuccheri, con prevalenza di glucosio, saccarosio, mannitolo, fruttosio, galattosio, cellulosa e pectine; acidi organici quali acetico, malico, fumarico, glicerico, lattico, citrico, succinico, ossalico e tartarico; sostanze azotate tra le quali sono presenti tutti gli amminoacidi; i tannini; polialcoli; proteine e lipidi.

La frazione inorganica è costituita da sali inorganici, tra cui fosfati, carbonati, silicati, solfati, cloruri; da cationi quali potassio principalmente, sodio, calcio, magnesio [42]. Sono presenti anche le antocianidine [43].

2.2 SMALTIMENTO, IMPATTO AMBIENTALE E NORMATIVA

La presenza dei polifenoli, scarsamente biodegradabili, fa sì che le WW siano difficili da smaltire; se si considera inoltre, il potere inquinante degli stessi, lo smaltimento delle WW costituisce un vero e proprio problema per i paesi produttori di olio d'oliva. Infatti, un inadeguato smaltimento può portare danni ai terreni ed alle acque sia superficiali che sotterranee, a causa della formazione di sostanze tossiche per opera

di batteri anaerobi e per la presenza di sali e di polifenoli presenti nelle WW, che svolgono un'azione fitotossica ed erbicida, in quanto inibiscono la germinazione, la crescita e lo sviluppo di molte piante erbacee.

In passato era consentito che le WW venissero riversate nella rete fognaria civile, ma in seguito all'applicazione della Legge Merli (n.319 del 1976) gli scarichi di WW furono vietati in corsi d'acqua o fognature urbane se non dopo trattamenti in appositi impianti di depurazione.

Successivamente, negli anni '80, appurato che lo smaltimento delle WW sui terreni agricoli avesse un impatto ambientale inferiore rispetto al riversamento nelle acque superficiali, esso fu ufficialmente regolamentato con la legge 574/96 la quale stabilisce che *lo spandimento delle WW deve essere realizzato attraverso un'idonea distribuzione ed incorporazione delle sostanze sui terreni in modo da evitare conseguenze tali da mettere in pericolo l'approvvigionamento idrico, nuocere alle risorse viventi e al sistema ecologico.*

Tuttavia è vietato spargere le WW sulle seguenti categorie di terreni:

- *Sui terreni situati a distanza inferiore di 300 metri dalle aree di salvaguardia delle captazioni di acque destinate al consumo umano;*
- *I terreni situati a distanza inferiore a 200 metri dai centri abitati;*
- *I terreni investiti da colture orticole in atto;*
- *I terreni in cui siano localizzate falde che possono venire a contatto con le acque di percolamento del suolo e comunque i terreni in cui siano localizzate falde site ad una profondità inferiore a 10 metri;*
- *Terreni innevati, gelati, saturi d'acqua e inondati.*

Questa legge è stata sostituita dalla legge 152/2006 la quale specifica che lo spandimento delle WW sui terreni agricoli deve essere volto a migliorare la qualità del terreno stesso, attraverso l'utilizzazione delle sostanze nutritive presenti nelle suddette acque, sempre nel rispetto però, delle acque di superficie e di falda, limitando le esalazioni maleodoranti.

A questo scopo, sono stati messi a punto diversi metodi di smaltimento delle acque reflue olearie che nello stesso tempo danno origine a fertilizzanti di alta qualità [44].

Il compostaggio, ad esempio, è un processo aerobio, che permette di ottenere un compost con effetti benefici sulla biofertilità del terreno, condotto su dei supporti in genere di legno come il tiglio o il pioppo, compatibili con gli scambi gassosi che avvengono nelle reazioni biologiche; tale processo è utilizzato per umificare la sostanza organica in cui il residuo oleario viene combinato con residui ligno-cellulosici, come ad esempio paglia di grano, stocchi di mais, scarti di cotone addizionati con fonti di azoto (urea, fanghi) [45].

Gli impianti di compostaggio sono a bioreattori aperti: il bioreattore è costituito da vasche o corsie aperte provviste di macchine rivoltatrici le quali permettono, come suggerisce il termine stesso, il mescolamento della biomassa per far in modo che la reazione avvenga in modo omogeneo. Questo trattamento prevede una fase di stabilizzazione della miscela di cinque settimane e un'ulteriore fase di maturazione che dura tre settimane e controlli costanti su vari parametri quali umidità, temperatura, citotossicità e pH.

Ideato per lo smaltimento delle acque di vegetazione è l'impianto *FCC* (fertilizzazione confinata e controllata) il cui uso è previsto nel brevetto europeo EP1216963 emanato dall'ISIRIM (Istituto Superiore di Ricerca e Formazione sui materiali speciali per le tecnologie avanzate). Tale impianto sfrutta il processo di fitodepurazione che utilizza le piante per decontaminare i suoli grazie alla loro capacità di assorbire, degradare, accumulare sostanze presenti nell'ambiente in cui vivono.

Questo nuovo impianto presenta dei vantaggi e delle novità rispetto alla fertilizzazione classica o ai depuratori generalmente usati per il trattamento delle WW. Innanzitutto, le ripercussioni sull'ambiente sono nulle o comunque basse rispetto ai depuratori e alla ferti-irrigazione classica che produce esalazioni maleodoranti e danni alle colture e alle falde; lo smaltimento è controllabile rispetto a quello non controllabile della ferti-irrigazione classica, ed è presente un guadagno economico dovuto alla produzione di biomassa e quindi di energia, rispetto ai costi elevati dei depuratori.

L'*FCC* appare come un pioppeto percorribile con i tradizionali mezzi agricoli dal quale poi, con il passare degli anni si può avere un ritorno economico, come già detto, grazie alla produzione di legname da biomassa.

Le WW, dopo essere state convogliate nell'impianto, vengono fatte stazionare per tutto il periodo invernale subendo una prima trasformazione anaerobica; con l'inizio

della primavera, il refluo viene fatto fluire attraverso una rete idraulica che lo condurrà a stretto contatto con il terreno, nella porzione in cui sono presenti le radici delle piante; la componente organica, già parzialmente trasformata nel periodo invernale, subirà un'ulteriore degradazione andando ad arricchire il terreno, mentre l'acqua e i composti mineralizzati saranno assorbiti dalle piante che li utilizzeranno per la crescita; le piante poi, al momento opportuno, potranno essere tagliate da tradizionali attrezzature agricole e destinate alla produzione di biomassa [46].

Un altro nuovo sistema di smaltimento è stato brevettato da una società spagnola (Clewer Oleoreacto), che sfrutta la capacità di un nuovo batterio di decomporre, in determinate condizioni, il carico di COD presente all'interno di un reattore chiamato Rotating Bed Biofilm Reactor (RBBR) con bassissimo consumo energetico e senza costi di manutenzione perché privo di parti meccaniche, consentendo lo scarico del refluo trattato a cielo aperto.

Ancora, un altro brevetto nazionale e internazionale, è stato messo a punto dalla Science Technology Consulting srl (STC) volto alla produzione di biogas: una miscela di metano e anidride carbonica, ottenuta dopo digestione anaerobica, esso rappresenta una fonte di energia rinnovabile. Tale digestione viene condotta su un reattore a due stadi: durante il primo avvengono idrolisi enzimatiche che portano alla riduzione della masse molecolari con formazione di acidi organici a basso peso molecolare i quali poi verranno utilizzati durante il secondo stadio da microrganismi per la formazione dei biogas.

Recentemente, l'Ente per le nuove tecnologie, l'energia e lo sviluppo economico sostenibile (ENEA) ha messo a punto un brevetto internazionale volto ad eliminare il carico inquinante dei polifenoli recuperandone invece le proprietà antiossidanti.

Il brevetto prevede il recupero non solo dei polifenoli ma anche di tutte le sostanze organiche, quali proteine, zuccheri e sali minerali per poi destinarle ad un uso alimentare.

Il processo ENEA impiega tecnologie separative di membrana che danno origine a cinque frazioni liquide che hanno composizione chimica diversa: le prime due risultano impoverite di polifenoli e possono essere destinate alla produzione di energia elettrica o biogas attraverso un processo anaerobico; la terza e la quarta sono ricche di verbascoside e idrossitirosole che possono essere trasformati in prodotti come ad esempio integratori alimentari; l'ultima, è costituita da un'acqua ultrapura

povera di sali minerali e ricca di potassio cloruro, la quale potrebbe essere impiegata come base per bevande speciali oppure nel settore cosmetico.

Le fasi che si susseguono possono essere riassunte come segue: ad una fase di acidificazione, ne segue una di idrolisi enzimatica con enzimi pectolitici e una di centrifugazione; si procede poi con quattro diverse tecniche di filtrazione che prevedono che i filtrati passino attraverso membrane a porosità decrescente; ne risulteranno poi le cinque diverse frazioni sopra citate.

In definitiva, il processo ENEA consente il recupero, attraverso il frazionamento delle WW, di tutte le sostanze in essa contenute di interesse alimentare, cosmetico ed energetico eliminandone il carico inquinante [46].

2.3 IMPORTANZA COMMERCIALE ED ECONOMICA DEI PRODOTTI A BASE DI ESTRATTI DI ACQUE DI VEGETAZIONE (WW)

Il corretto smaltimento delle WW è importante, oltre che da un punto di vista ecologico, anche da un punto di vista commerciale: a livello internazionale, infatti, sta prendendo piede, la produzione e la vendita di prodotti a base di estratti di acque di vegetazione (soprattutto quelli a base di idrossitirosolo) anche se al momento occupano ancora una piccola fetta di mercato [47]. Rispetto agli estratti naturali, derivanti da prodotti vegetali di altra origine, quelli di matrice olivicolo-olearie, essendo derivati da prodotti di scarto, non hanno ripercussioni sull'ambiente dato che, come già detto, il potere inquinante viene eliminato durante lo smaltimento, comportano una spesa pari a zero per le aziende olivicolo-olearie, e rappresentano una fonte economica territoriale trattandosi di prodotti autoctoni.

Tra i prodotti a base di idrossitirosolo commercializzati per esempio troviamo, nel mercato americano, due *food supplements*: uno, IDROX, possiede attività antiossidanti, antinfiammatorie e preventive nei confronti delle malattie cardiovascolari; esso viene inoltre usato come stabilizzante di alimenti, nel settore cosmetico, nella formulazione di functional food e in produzioni industriali; l'altro, OLIVENOL, è un integratore composto da polifenoli di polpa di oliva, anch'esso con

proprietà antinfiammatorie è consigliato per la prevenzione di malattie cardiovascolari [47].

Come è facile notare, questi prodotti a base di estratti di WW, possono essere usati in diversi settori quali: quello fitoterapico da aziende che producono integratori con proprietà antiossidanti ed anti-radicaliche; quello alimentare da aziende che producono ad esempio barrette di cereali, prodotti da forno, oli arricchiti e prodotti lattiero/caseari; quello cosmetico da aziende che producono appunto cosmetici contenenti vitamine, estratti naturali, antiossidanti ed oli essenziali [48]. Inoltre, c'è da considerare il ritorno economico evidenziato dall'investimento in impianti destinati alla produzione di energia elettrica da biomassa grazie agli incentivi concessi ai produttori di energia dall'UE, dallo Stato, dalle regioni, accompagnato da un'importanza sociale in termini occupazionali per il territorio.

Risultano interessanti dunque le prospettive per quanto concerne l'uso dei prodotti di scarto, in questo caso il refluo oleario che rappresenta una vera e propria risorsa agronomica, commerciale ed economica nel rispetto dell'ambiente.

3.POLIFENOLI E CANCEROGENESI

La cancerogenesi è un processo multistadio che può essere suddiviso in tre fasi principali: iniziazione, promozione e progressione [49,50]. L'iniziazione è formata da una serie di eventi attraverso i quali un cancerogeno esogeno o endogeno, induce alterazioni a livello del materiale genetico della cellula provocando una lesione che può essere ereditata e che conferisce alla cellula una crescita neoplastica. Questo cambiamento di solito avviene in seguito all'attivazione metabolica di un pro-cancerogeno. La potenza relativa del cancerogeno sembra essere determinata dalla stabilità degli addotti formati con il DNA e dall'abilità di indurre alterazioni ereditarie nei geni target [51].

Nella fase di iniziazione, le cellule possono opporsi ai cancerogeni tramite l'attivazione di differenti enzimi detossificanti come quelli di fase I e di fase II.

Tuttavia gli enzimi di fase I dalla reazione con i cancerogeni formano potenti elettrofili, in grado di interagire con il DNA, causando un danno all'acido nucleico e l'insorgenza di mutazioni. Sebbene gli enzimi di fase II possano detossificare questi composti attraverso la formazione di coniugati con il glutatione o con i solfati formando solubili in H₂O e quindi facilmente eliminabili dall'organismo, questo meccanismo di difesa è spesso inadeguato.

La fase di promozione tumorale è caratterizzata dalla proliferazione cellulare che è indotta dall'attivazione e/o sovraespressione di enzimi coinvolti nella sintesi di nucleotidi e DNA (ornitina decarbossilasi) e nella regolazione del processo di differenziamento (DNA polimerasi e topoisomerasi II). Inoltre durante la fase di promozione tumorale si verifica una iperproduzione di ROS, principalmente dovuta ad una sovraespressione di enzimi pro-ossidanti (cicloossigenasi e lipossigenasi) che portano ad un danno cellulare ed anche a mutazioni del DNA. Nella fase di progressione, lo stadio finale del processo di cancerogenesi, le cellule mutate proliferano in maniera incontrollata con l'acquisizione di un potenziale neoplastico.

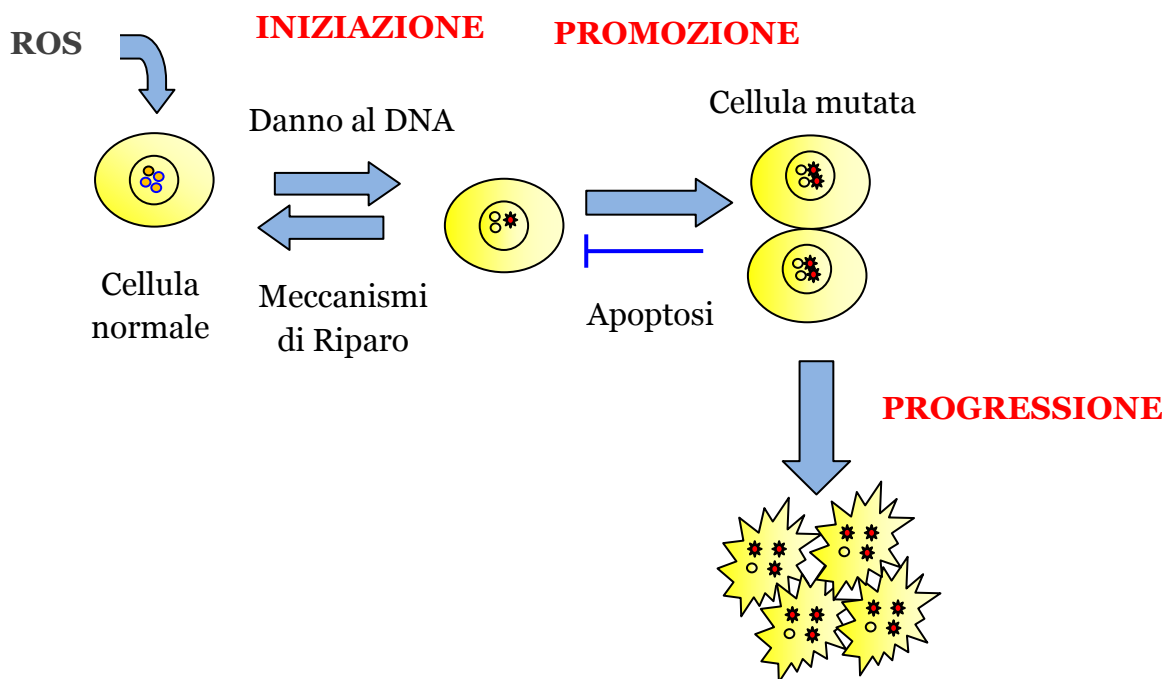


Fig. 1. Rappresentazione schematica delle tre fasi del processo di cancerogenesi indotto dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS).

3.1 EFFETTO PROTETTIVO DEI POLIFENOLI NATURALI

I composti fenolici assunti con la dieta e abbondantemente presenti nei vegetali e nella frutta, hanno dimostrato possedere attività preventive verso le patologie cronico-degenerative quali le malattie cardiovascolari ed i tumori [52]. I polifenoli possono influenzare tutti i processi della cancerogenesi attraverso vari meccanismi. In particolare i polifenoli aiutano a contrastare la comparsa dello stress ossidativo [53,54] e così facendo possono prevenire lo sviluppo di una formazione neoplastica. Infatti, attraverso la variazione della quantità di ROS presenti nelle cellule cancerogene, i polifenoli possono interferire con la trasduzione del segnale, l'attivazione di fattori di trascrizione e l'espressione di specifici geni che influenzano la proliferazione cellulare e l'apoptosi [55,56].

I più noti composti fenolici derivati da alimenti sono: il resveratrolo, presente in grande quantità nel vino rosso; le catechine, presenti nel tè; i flavonoidi del cioccolato ed i polifenoli dell'olio di oliva che si sono dimostrati particolarmente interessanti per la loro abilità nell'influenzare un ampio spettro di mediatori intracellulari coinvolti nell'iniziazione, promozione e progressione del processo tumorale [57-59]. Ad esempio il resveratrolo, è in grado di inibire i processi infiammatori agendo sull'espressione della cicloossigenasi 2, (COX-2), coinvolta nella formazione di mediatori pro-infiammatori quali le prostaglandine, PGE2 [60]. L'incremento dell'attività di enzimi, quali la glutazione perossidasi, la catalasi, la NADPH-chinone ossidoreduttasi, la glutazione transferasi, in seguito all'azione dei polifenoli, può aiutare nella detossificazione degli agenti cancerogeni [61].

Inoltre, i polifenoli possono modulare l'attività delle molecole segnale, come la MAP chinasi, che sono coinvolte nella proliferazione delle cellule tumorali [62]. La via delle MAP chinasi è stata vista a lungo con interesse nella formulazione di terapie anti-tumorali, poiché riveste un ruolo centrale sia nella regolazione della crescita e della sopravvivenza cellulare, che nella trascrizione e nell'attivazione post-trascrizionale di COX-2 [63,64].

Dunque, i polifenoli costituiscono una classe di composti interessanti per le loro potenzialità in campo terapeutico che certamente devono essere ulteriormente investigate, ma che comunque aprono nuovi scenari allo sviluppo di terapie contro varie malattie, *in primis* il tumore. Nel caso specifico delle neoplasie, si pensa che

questi composti possano inibire il processo tumorale in ciascuna delle tre fasi sopra riportate. Per quanto riguarda la fase di iniziazione si è ipotizzato un possibile meccanismo di “scavenger” dei radicali liberi in grado di ridurre il danno ossidativo al DNA. Inoltre l'eccesso di ROS potrebbe essere neutralizzato dai composti fenolici e di conseguenza i geni attivati dallo stress ossidativo potrebbero essere soppressi e la crescita tumorale inibita [65]. Dall'altro lato però, i polifenoli alle alte concentrazioni, possono indurre la formazione dei ROS a livelli tali da non essere tollerati dalle cellule tumorali [66]. Al raggiungimento di questo valore soglia, si potrebbero attivare geni importanti per l'arresto del ciclo cellulare e dell'induzione di apoptosi (fase di promozione/progressione) [67]. Quindi questi polifenoli possono, paradossalmente, sia fungere da scavenger di ROS, che generare una quantità aggiuntiva di specie reattive dell'ossigeno in grado di inibire la proliferazione delle cellule tumorali. Entrambi i meccanismi d'azione sembrano essere strettamente collegati alla concentrazione dei fenoli ed alle condizioni sperimentali. E' stato infatti osservato che basse o alte concentrazioni di questi composti, sono responsabili della loro attività antiossidante o pro-ossidante, rispettivamente [68,69].

3.2 EFFETTO PROTETTIVO DEI POLIFENOLI DELL'OLIO DI OLIVA

Gli effetti benefici di questi composti per la salute umana sono molto vari e dipendono principalmente dalla capacità che essi hanno di comportarsi come potenti antiossidanti e scavenger dei radicali liberi, come già detto precedentemente [70-74], prevenendo a diversi livelli il danno cellulare indotto dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS). Il composto fenolico dell'olio di oliva maggiormente studiato in questi ultimi anni, è stato l'idrossitirosolo (3,4-DHPEA) oggetto di un considerevole interesse per la sua forte capacità antiossidante [75-77]. E' stato dimostrato che il 3,4-DHPEA è in grado di proteggere i PBMC umani dal danno provocato da un contaminante ambientale tossico, il 2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-*p*-diossina (TCDD) che provoca un danno al DNA con generazione di basi ossidate e rotture del DNA a singolo filamento ed anomalie cromosomiali indotte da stress ossidativo [78]. Un ulteriore effetto protettivo di alcuni composti fenolici dell'olio, è stato osservato nei

confronti del danno provocato dal benzo-[a]-pirene nei microsomi del fegato di ratto [79]. Inoltre l'idrossitirosolo è in grado di inibire il danno al DNA provocato dal perossido d'idrogeno nelle cellule Jurkat e di prevenire il danno ossidativo nelle cellule intestinali CaCo-2 [80]. Il 3,4-DHPEA protegge efficacemente le cellule isolate dall'aorta di ratto dal danno indotto dallo stress ossidativo provocato da NO [81] ed ha un'azione anti-tumorale nella linea promielocitica umana, HL60 e nelle cellule di colon HT29, attraverso il blocco del ciclo cellulare, la riduzione della crescita e della proliferazione e l'induzione di apoptosi [82,83]. Infatti, alle alte concentrazioni (100-400µM), l'idrossitirosolo inibisce la proliferazione cellulare, arresta il ciclo in fase G₁ con un proporzionale incremento delle cellule in fase G₀/G₁ ed un concomitante declino nella fase S e nella fase G₂/M. I meccanismi proposti che giustificerebbero questi eventi sono un'inibizione da parte dell'idrossitirosolo delle chinasi ciclina-dipendenti; un'induzione delle proteine inibitrici (p21 e p27) delle chinasi ciclina-dipendenti ed infine un'inibizione delle specie reattive dell'ossigeno, che fungono da messaggeri nella proliferazione cellulare [84]

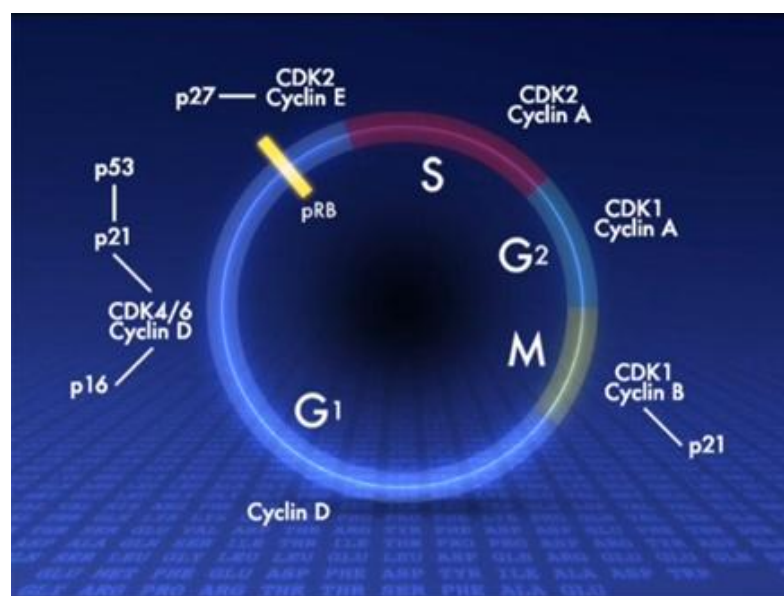


Fig. 2 Proteine coinvolte nelle diverse fasi del ciclo cellulare. I complessi CDK-ciclina (CDK1/Ciclina A, CDK1/Ciclina B, CDK4/6 Ciclina D) favoriscono la progressione del ciclo cellulare, mentre l'attivazione di proteine (p16, p21, p27, p53) inibitrici del ciclo cellulare ne causano l'arresto. La proteina Rb è un soppressore tumorale ed è normalmente fosforilato durante la progressione del ciclo cellulare (pRb), mentre la sua defosforilazione provoca l'arresto del ciclo prima della replicazione del DNA (fase S).

Quindi, i polifenoli possono esercitare questi effetti anticancerogeni attraverso diversi meccanismi che comprendono, come visto in precedenza, l'inibizione del danno al DNA, il blocco del ciclo cellulare e l'induzione dell'apoptosi, attraverso la modulazione dell'attività di alcuni enzimi coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare, nel riparo del DNA e nel processo infiammatorio [85-89].

4. METABOLITI DEI COMPOSTI ORGANICI VOLATILI (COV) E CANCEROGENESI

I composti organici volatili (COV) includono sia gli idrocarburi contenenti carbonio ed idrogeno come unici elementi (composti alifatici e composti aromatici) che composti contenenti oltre a carbonio e idrogeno, anche altri elementi quali ossigeno, cloro e fluoro (aldeidi, eteri, alcool, esteri, clorofluorocarburi [CFC] ed idroclorofluorocarburi [HCFC]. La US Environmental Protection Agency (EPA) definisce i COV come una classe di sostanze contenenti C₂-C₁₀ idrocarburi sostituiti e non sostituiti con una pressione di vapore superiore a 0,1 mmHg. Una ulteriore classificazione prevede la suddivisione dei COV in polari e non polari. [90].

I composti organici volatili sono rilasciati nell'atmosfera sia da fonti biogeniche (principalmente vegetazione) che da sorgenti di origine antropica (ad esempio, le emissioni dei veicoli, la fabbricazione e l'uso di prodotti petroliferi, combustione di biomasse, discariche e impianti di trattamento delle acque reflue) dove subiscono vari processi di degradazione chimica [91]. La quantità delle emissioni biogeniche è di oltre il 90% dei COV totali presenti nell'atmosfera [92-94].

L'emissione dei COV nell'ambiente è monitorata non solo per il loro coinvolgimento nell'aumento dei livelli di ozono troposferico (a livello del suolo) o per la diminuzione dei livelli di ozono stratosferico, ma anche per i loro effetti tossici sulla salute umana [95-97]. L'ozono troposferico, un inquinante fotochimico secondario, risultante primariamente dalla reazione dei COV con NO_x (NO e NO₂) in presenza di luce, è il

maggior componente dello smog [98-100], mentre l'ozono stratosferico che protegge la Terra dalle radiazioni ultraviolette del sole, diminuisce a causa della sua reazione con gli alogenati dei COV (ad es., tetraclorometano, 1,1,1-tricloroetano, i clorofluorocarboni CFC-11, CFC-12 e CFC-113) [101]. Si ritiene che un'alta percentuale del rischio di sviluppare una neoplasia associato agli inquinanti dell'aria (35–55%) sia dovuta all'esposizione prolungata ai COV [102-104].

Infatti, sulla base dei dati pubblicati in letteratura, la International Agency for Research on Cancer (IARC) ha introdotto nella lista delle sostanze cancerogene, alcuni COV e loro metaboliti (Tabella 1). In particolare 1,3-butadiene è stato inserito nel Gruppo 1 (cancerogeni), lo stirene ossido (SO) nel Gruppo 2A (probabili cancerogeni) e l'isoprene ossido (IO), il propilene ossido (PO) e l'epossi butano (BO) nel Gruppo 2B (possibili cancerogeni) [105].

Fig 3. Struttura degli epossidi di alcuni COV

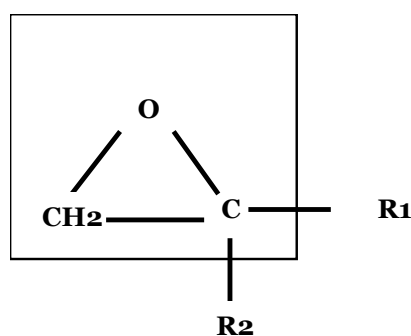


Tabella 1. I composti sono classificati in base al loro rischio cancerogeno nell'uomo secondo le procedure standard dello International Agency for Research on Cancer (IARC) nel seguente modo: Gruppo 1 (cancerogeni); Gruppo 2A (probabili cancerogeni); Gruppo 2B (possibili cancerogeni); Gruppo 3 (non classificati come agenti cancerogeni). N.C.: non considerati dallo IARC

Composti parentali	Epossidi	Sostituenti		IARC group
		R1	R2	
1,3-Butadiene				1
	3,4-Epossibutene (EB)	-CH=CH₂	-H	N.C.
	1,2,3,4-Diepossibutene (DEB)	-CH(O)CH₂	-H	N.C.
Isoprene				2B
	3,4-Eossi-3-metil-1-butene (IO)	-CH=CH₂	-CH₃	N.C.
Stirene				2B
	Stirene 7,8-ossido (SO)	-C₆H₅	-H	2A
Propilene				3
	Propilene ossido (PO)	-CH₃	-H	2B
1-Butene				N.C.
	1,2-Eossi-butano (BO)	-CH₂-CH₃	-H	2B

Generalmente gli alcheni vengono metabolizzati da specifici enzimi (enzimi di fase I e di fase II) che li trasformano in sostanze più solubili con il fine di renderli facilmente eliminabili dall'organismo. In particolare questi composti vengono prima attivati per mezzo dei così detti enzimi di fase I, (ad es. il Citocromo P450) provocando la conversione dell'alchene in un composto altamente reattivo. Infatti la presenza del doppio legame rende questi composti ottimi substrati per gli enzimi del citocromo P450 che li converte nei rispettivi epossidi (Fig.3, Ta.1) i quali possiedono una potente capacità alchilante verso i siti nucleofili di proteine e DNA [106]. Successivamente questi composti attivati vengono detossificati dagli enzimi di fase II, quali la glutatione trasferasi, che converte queste sostanze in metaboliti più stabili che possono essere direttamente eliminati con le urine.

I dati presenti in letteratura mostrano chiaramente la formazione dei metaboliti degli epossidi come un evento centrale nella genotossicità e cancerogenicità di molti COV. Ad eccezione dell'isoprene monoepossido (3,4-epossido-2-metil-1-butene: IO), tutti gli altri epossidi sono risultati positivi al test di Ames sul ceppo di *Salmonella typhimurium* TA100 e per gli altri test di mutagenicità procariotici [107,108]. La valutazione genotossica, determinata attraverso differenti caratteristiche citogenetiche, quali le aberrazioni cromosomiali (CA), lo scambio di cromatidi fratelli (SCE) ed il test dei micronuclei (MN), hanno evidenziato differenti abilità degli epossidi sopra riportati nel provocare un danno al DNA anche con risultati contrastanti.

Fino a questo momento non sono disponibili dati sugli effetti di IO "in vitro" riguardo l'induzione di CA, SCE e MN, mentre il 3,4-epossido-1-butene (EB) è in grado di indurre SCE in linfociti umani come dimostrato in uno studio [109] mentre in un altro studio tale attività non è stata riscontrata [110]. Sono pochi gli studi che hanno investigato i potenziali effetti degli epossidi sopra riportati sul danno al DNA nelle cellule umane. In particolare, nel caso di EB (epossido del 1,3-butadiene) l'abilità di indurre un danno al DNA è stata ben valutata attraverso il Comet Assay in cellule di sperma umano [111]. Recentemente il danno al DNA indotto da EB, DEB e la loro miscela è stata studiata anche nei linfociti umani [112]. L'effetto di PO sul danno al DNA è stato investigato solo in fibroblasti diploidi umani [113], mentre Fabiani et al., 2007 [114], in un precedente studio hanno dimostrato una chiara attività genotossica sia dell'isoprene, in presenza di attivazione metabolica, che del suo epossido (IO) in

linfociti umani. Un solo studio fino ad oggi, è stato pubblicato, che dimostra l'attività genotossica del BO in cellule della mucosa del naso dell'uomo e del ratto tramite il Comet Assay. [115].

4.1 1,3-BUTADIENE

In questi ultimi anni gli effetti genotossici e cancerogeni dell'1,3-butadiene (BD) hanno rivestito un particolare interesse in tutto il mondo. Lo IARC ha classificato il BD come probabile cancerogeno per l'uomo (gruppo 2A) sulla base di "sufficienti evidenze" di un aumentato rischio di leucemia [113] e come possibile cancerogeno nelle sperimentazione animale [116]. Studi epidemiologici hanno rivelato una chiara associazione tra l'esposizione occupazionale al BD e l'incremento del rischio di leucemia [117]. L'US Environmental Protection Agency (EPA) ha stimato che BD è responsabile della maggior parte dei tumori riconducibili alle esposizioni delle emissioni degli autoveicoli, rispetto alle particolato derivato dalla combustione del gasolio, benzene e formaldeide insieme [118]. BD è un cancerogeno ben noto nei roditori, in quanto è in grado di indurre i tumori in differenti siti-specifici specialmente nel topo [119,120]. La grande variazione degli effetti genotossici del BD tra le differenti specie e la presenza di fattori contraddittori riscontrati in molti studi epidemiologici, rendono difficile la valutazione del rischio per l'uomo associato all'esposizione al BD. Questa complessa questione infatti, deve essere ulteriormente approfondita anche considerando le differenze nella metabolizzazione del BD tra l'uomo ed i roditori.

Il BD è principalmente ossidato dal citocromo P450 (soprattutto CYP2E1 e CYP2A6) in 1,2-epossi-3-butene, (EB) e in 3,4-epossi-1, 2-butandiolo (DEB). L'EB può essere ulteriormente metabolizzato attraverso diverse vie. Una è la detossificazione, tramite la coniugazione diretta con il GSH, portando alla formazione di metaboliti mono-idrossilati. La seconda via è l'idrolizzazione da parte dell'epossido idrolasi (EH) a 3-butene-1,2-diolo, che può essere o eliminato come tale nelle urine, o coniugato al GSH per formare i di-idrossilati metaboliti anch'essi escreti nelle urine, o ossidato dal citocromo P450 a EB-diolo. Il terzo percorso è l'ossidazione di EB da parte di CYP2E1 e CYP3A4 per formare DEB, che può essere idrolizzato a EB-diolo, o essere coniugato

al GSH per formare un tri-idrossilato, altro metabolita urinario [121]. Ciascuno dei metaboliti ossidati è un epossido che può reagire con macromolecole biologiche quali DNA, RNA e proteine [121].

Diversi studi indicano chiaramente la capacità di BD e dei suoi metaboliti, di reagire con i centri nucleofili del DNA, provocando la formazione di addotti al DNA in animali da esperimento [122,123].

Una relazione dose-risposta tra l'inalazione di 1,3-[2,3-¹⁴C]-butadiene e la formazione di addotti al DNA, rilevata con N⁷-(2,3,4-trihydroxybutyl)-guanina, è stata descritta nel fegato, nei polmoni e nei testicoli di topi e di ratti, sebbene i livelli complessivi di addotti al DNA, siano stati piuttosto bassi [124]. E' stato dimostrato che questo composto è in grado di indurre un danno cromosomico ed effetti clastogenici nei topi [125,126] i quali sono notevolmente più sensibili rispetto ai ratti [127]. I risultati sugli effetti citogenetici e sulle mutazioni indotte nell'enzima ipoxantina-guanina fosforibosil-transferasi (HPRT) nei lavoratori esposti a BD, sono controversi: alcuni studi mostrano un aumento significativo nella formazione di addotti [128], mentre altri riferiscono risultati negativi [129,130]. Questi dati contraddittori possono essere correlati alle differenze inter-individuali nell'attività metabolica e nella capacità di riparazione del DNA. Infatti sembra che la genotossicità/cancerogenicità indotta dal BD sia anche una conseguenza della alterazione dei sistemi coinvolti nella riparazione del DNA come suggerito da Vodicka et coll. [131], che hanno descritto una significativa riduzione del tasso di riparazione del DNA nei lavoratori esposti a BD.

Queste evidenze suggeriscono che l'esposizione professionale a xenobiotici, possa influenzare i meccanismi di riparo del DNA [132] e quindi anche le differenze genetiche tra individui giocano un ruolo primario nella modulazione del metabolismo di queste sostanze cancerogene [133,134].

4.2 STIRENE

Lo stirene-7,8-ossido (SO) è il principale metabolita dello stirene, un solvente organico ampiamente utilizzato nella produzione di materie plastiche, resine, isolanti e gomma sintetica. La massima esposizione umana di stirene avviene quando il composto è inalato durante la laminazione a mano del vetroresina [135]. In queste

fabbriche, SO è prodotto sia dallo stirene in presenza di aria e luce, sia nel momento dell'aggiunta dei perossidi alla resina quali iniziatori della reazione di polimerizzazione [12].

Tuttavia, lo stirene è presente in piccole quantità anche in alcuni alimenti (ad esempio le fragole, il frumento, le arachidi, la carne e le spezie) e può anche essere prodotto naturalmente come metabolita durante i processi di imballaggio di alcuni cibi e bevande (es. vino, birra, cereali e formaggi) [136]. SO è stato classificato dallo IARC nel gruppo 2, con sufficiente evidenza di cancerogenicità negli animali da esperimento (gruppo 2A) e come probabile cancerogeno nell'uomo, a causa di evidenze epidemiologiche inadeguate (gruppo 2B) [105]. La preoccupazione per la sua potenziale cancerogenicità deriva in gran parte, dalla capacità del suo metabolita lo SO, di legarsi covalentemente al DNA e di risultare fortemente attivo in una varietà di test di genotossicità [117,137].

Numerosi studi hanno evidenziato che SO possa rappresentare un potenziale cancerogeno in lavoratori professionalmente esposti, soprattutto per quanto riguarda le neoplasie del sistema linfatico ed ematopoietico [138-140]. L'esposizione a stirene sul posto di lavoro è costantemente diminuita nel corso degli anni a causa di una maggiore attenzione alla salute del lavoratore e alla presenza di normative più severe, ma rimane sostanzialmente elevata l'esposizione a questo composto al di fuori dell'ambito lavorativo [137].

“In vivo”, lo stirene viene metabolizzato a SO dal citocromo P450, isoforme 2B6 e 2E1 (presenti sia nel fegato umano che nel polmone) e dalla isoforma 2F1 (presente solo nel polmone umano) che è il più efficace nel processo di ossidazione [141,142]. Lo SO è principalmente idrolizzato dalla epossido idrolasi microsomiale (mEH) a glicole-stirene e successivamente ossidato, dall'alcool deidrogenasi, a due principali metaboliti, l'acido mandelico (MA) e l'acido fenilglicosilico (PGA), come illustrato nella Figura 4. Entrambi, MA e PGA, rappresentano più del 95% dei metaboliti dello stirene ossido. L'ulteriore trasformazione di MA e PGA mediante transaminazione nel corrispondente amminoacido, porta alla formazione di fenilglicina. Negli esseri umani, una via metabolica minore (circa l'1% dello stirene assorbito) è dovuta alla coniugazione di SO con glutathione (GSH) per mezzo dell'enzima glutathione S-transferasi (GST). Questa reazione avviene su uno dei due atomi di carbonio nella catena laterale formando il composto N-acetil- S-(1-fenil-2-idrossi)-etil-L-cisteina

(M1) ed N-acetil-S-(2-fenil-2-idrossi)-etil-L-cisteina (M2), che sono regioisomeri, ciascuno esistenti in due forme diastereoisomeriche ([R, R] e [R, S]). Tuttavia, è presente anche un percorso aggiuntivo secondario del metabolismo dello stirene causato dall'eossidazione dell'anello benzenico nella posizione C-3,C-4 dando luogo alla formazione del 4-vinilfenolo, anch'esso escreto nelle urine [143,144].

L'abilità dello SO di indurre rotture ai filamenti di DNA nelle cellule di mammifero è stata ben documentata sia "in vitro" [145] che "in vivo" [146]. Infatti, studi condotti in diversi sistemi di cellule di mammifero ed eucarioti inferiori, trattati "in vitro" con SO, hanno dimostrato l'induzione di scambi di cromatidi fratelli (SCE), la formazione di micronuclei (MN) e la formazione di aberrazioni cromosomiche (CA) [147,148]. Inoltre, cambiamenti nell'espressione di alcuni geni coinvolti nel ciclo cellulare e nella regolazione dell'apoptosi sono stati descritti nei linfociti umani esposti ad SO [149]. Uno studio "in vitro" nei linfociti periferici umani (PBMC) sugli effetti genotossici di SO, ha evidenziato una riduzione dose-dipendente della sopravvivenza cellulare, un aumento della mutazione del gene ipoxantina fosforibosil (HPRT), la formazione di addotti al DNA e un incremento del numero di rotture del DNA [150]. SO ha mostrato preferenzialmente un'attività clastogenica ed ha prodotto un effetto citostatico ad alte dosi, indicato dalla riduzione significativa della proliferazione cellulare [150]. Per esempio, per quanto riguarda gli studi "in vivo", Somorovska et al. [151] hanno esaminato 44 lavoratori impiegati come laminatori presso un impianto di materia plastica rinforzata. Da questi dati è emersa una forte correlazione tra la frequenza delle rotture del DNA a singolo filamento in leucociti mononucleati e gli anni di esposizione allo SO in fabbrica. Tuttavia lo studio degli effetti dello stirene nell'uomo ha evidenziato risultati controversi e talvolta contrastanti. In letteratura infatti si trovano risultati, sia positivi che negativi, sull'associazione tra l'esposizione a stirene ed il danno cromosomiale [128].

Alcuni autori hanno ipotizzato un meccanismo di genotossicità diverso da quello precedentemente descritto (CA, MN e SCE), nel quale il danno al DNA poteva essere causato da un incremento delle specie reattive dell'ossigeno in seguito al metabolismo dello SO [16,152].

Infatti un'iperproduzione di ROS, o un loro ridotto smaltimento, dovuto a: un insufficiente apporto di sostanze antiossidanti con la dieta, un ridotto funzionamento di enzimi antiossidanti e una insufficiente disponibilità di micronutrienti, quali Mg,

Cu e Zn cofattori necessari per l'attività di questi enzimi, può provocare una variazione dello stato di equilibrio a favore di una situazione patologica, che è lo stress ossidativo, con conseguenti alterazioni a carico delle diverse classi di macromolecole biologiche.

Kato et al [153] hanno trovato un'aumentata perossidazione lipidica nel polmone e nel cervello di ratti dopo trattamento con stirene e/o SO, come conseguenza di ripetute deplezioni del glutathione al di sotto di certi livelli critici. E' stata anche dimostrata l'induzione di un danno ossidativo al DNA in lavoratori esposti a SO attraverso la formazione di basi ossidate, quale la 8-idrossi-2-deossiguanosina (8-OHdG), che è un indicatore del danno ossidativo al DNA [154] ed è usata comunemente come biomarker importante delle prime fasi del processo di cancerogenesi [155,156].

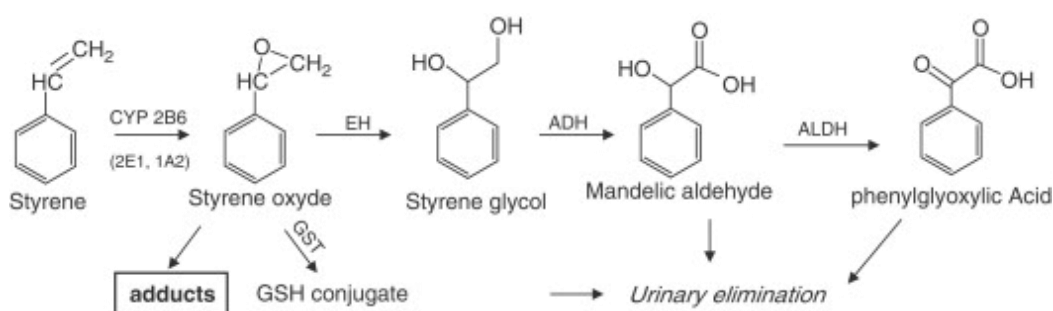


Fig.4. Biotrasformazione dello Stirene per opera degli enzimi del metabolismo umano

5. SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo di questo lavoro di tesi può essere suddiviso in due parti ben distinte.

La prima parte a sua volta, può essere riassunta in 4 punti:

1. Valutazione del potere anti-genotossico sia di estratti fenolici derivati dall'olio d'oliva e dalle acque di vegetazione che di singoli composti, nei confronti del danno al DNA indotto dal perossido di idrogeno (H_2O_2). I sistemi cellulari utilizzati sono stati i linfociti isolati di fresco dal sangue periferico umano (PBMC) e la linea tumorale derivata da una leucemia promielocitica acuta umana (HL60). Il perossido di idrogeno rappresenta un sistema semplice e riproducibile per poter testare l'effetto delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) su cellule "in vitro". I ROS sono particolarmente importanti, poiché continuamente rilasciati nell'organismo, sia come prodotti indesiderati del normale metabolismo aerobio cellulare, che come agenti battericidi la cui formazione è legata all'attivazione dei fagociti. Al fine di mimare in modo più fisiologico la produzione dei ROS in vivo è stata anche investigata la protezione dei polifenoli nei confronti del danno ossidativo al DNA indotto da monociti attivati con forbolo-miristato-acetato (PMA). Questo modello ha il vantaggio di esporre le cellule a molte specie reattive dell'ossigeno che sono costantemente prodotte a basse concentrazioni nell'organismo e che rappresentano una naturale fonte di stress ossidativo.
2. In un secondo momento, si è investigata l'attività genotossica di alcuni inquinanti di origine ambientale, quali i COV e i loro principali metaboliti, sia nei PBMC che nelle cellule HL60. Lo scopo di questo studio è quello di comparare gli effetti dei differenti epossidi, chimicamente correlati tra loro, nelle stesse condizioni sperimentali in modo da creare una scala di genotossicità per questi composti.

3. Inoltre, si è cercato di identificare il/i possibile/i meccanismo/i d'azione tramite il quale gli epossidi inducono il danno genotossico, ipotizzando il coinvolgimento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS).
4. Infine è stata valutata l'abilità chemiopreventiva degli estratti fenolici sopra riportati nei confronti del danno al DNA indotto dagli epossidi nei PBMC.

Nella seconda fase del lavoro ci si è proposto di studiare i meccanismi attraverso cui l'idrossitirosole (3,4-DHPEA; il più importante fenolo presente sia nell'olio d'oliva che nelle acque di vegetazione) interferisce con la promozione/progressione tumorale agendo come inibitore della proliferazione e del ciclo cellulare, e come induttore dell'apoptosi in cellule tumorali. Questa fase può essere suddivisa in due principali obiettivi:

1. chiarire se, ed in che misura, gli effetti anti-proliferativi e pro-apoptotici del 3,4-DHPEA siano mediati da un'attività pro-ossidante espletata da questo composto quando testato "in vitro" ad alte dosi. Particolari approfondimenti hanno riguardato la generazione da parte del 3,4-DHPEA del perossido di idrogeno (H_2O_2) nel terreno di coltura;
2. valutare gli effetti del 3,4-DHPEA nella progressione del ciclo cellulare delle HL60 e nell'espressione di alcune proteine coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare (Rb/pRb).

In questa seconda fase sono state utilizzate le cellule tumorali HL60 e non i PBMC, poiché in uno studio precedente, effettuato nel laboratorio in cui ho svolto questo lavoro di dottorato, è stato dimostrato che il 3,4-DHPEA non era in grado di indurre apoptosi nelle cellule non proliferanti, caratteristica che probabilmente le rende più resistenti all'azione di questo composto [82].

6. MATERIALI E METODI

6.1 MATERIALI E LINEE CELLULARI

Il terreno di coltura RPMI 1640, il siero fetale bovino (FBS) e l'agarosio a basso punto di fusione ed a normale punto di fusione sono stati ottenuti dalla Gibco (Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Scotland). Penicillina/Streptomicina e Glutamina sono stati acquistati dalla Sigma (Sigma-Aldrich Inc. St. Louis, MO USA). I convenzionali vetrini per microscopio sono stati acquistati da Knittel Glaser (Steroglass, Perugia, Italy). I diversi epossidi (3,4-epossio-3-metil-1-butene; 3,4-epossio-1-butene; 1,2:3,4-diepossibutene; Stirene 7,8-ossido; Propilene ossido; 1,2-epossibutano); Hystopaque 1077 e tutti gli altri reagenti sono stati acquistati dalla Sigma (Sigma-Aldrich CO. Ltd., Irvine, UK). La 2,7-diclorodihidrofluoresceina diacetato (DCFH-DA) (Sigma) è stata a 20 mM in DMSO e aliquotata a -20°C. La concentrazione finale di DMSO non eccedeva lo 0.1%.

L'Idrossitiroso è stato ottenuto dalla Cayman Chemicals Ltd. (Stati Uniti), come soluzione in etanolo (EtOH) alla concentrazione di 320 mM e conservato a -20°C e al riparo dalla luce. Il composto è stato quindi diluito in RPMI 1640 alle concentrazioni desiderate subito prima dell'uso. Tutte le soluzioni sono state sterilizzate mediante filtrazione con filtri da 0.22 µm (Celbio S.r.l., Milano). Tutti gli altri reagenti sono stati acquistati dalla Sigma (Sigma-Aldrich CO. Ltd., Irvine, UK), salvo diversamente specificato.

Le cellule di leucemia promielocitica umana HL60, le cellule di cancro al colon HCT116 ed SW480, le cellule di cancro al seno MCF-7 ed MDA-MB231 e le cellule di cancro alla prostata LNCap e PC3 sono state acquistate dall'American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). Le colture cellulari e i trattamenti sono stati allestiti utilizzando fiasche da 75cm², 25cm² e piastre 96 pozzetti. Le cellule sono state incubate a 37°C e al 95% di aria e 5% di CO₂ in atmosfera umidificata e mantenute in terreno RPMI 1640 completo addizionato con FBS (10% v/v), L-glutamina 2.0 mM, penicillina 100U/ml e streptomicina 100µg/ml. Le cellule sono state subcoltivate 2 volte a settimana e la loro vitalità è stata valutata con il metodo di esclusione del

trypan blu. La vitalità delle cellule mantenuta in coltura valutata con tale metodo è sempre maggiore o uguale al 90%.

Gli Anticorpi per la proteina Rb (total Rb e pRb) e la β -actina sono stati acquistati dalla Cell Signaling Technology.

6.2 PREPARAZIONE DEGLI ESTRATTI POLIFENOLICI

Gli estratti polifenolici derivati dall'olio di oliva della *cultivar Coratina*, sono stati forniti dal Prof. Servili del Dipartimento di Scienze Economico-Estimate e degli Alimenti, Università di Perugia, come soluzioni in EtOH, conservati a -20°C e al riparo dalla luce. La loro estrazione è avvenuta secondo le modalità riportate in letteratura [18]. Brevemente, da un campione di olio d'oliva come tale è stata effettuata un'estrazione in metanolo della componente polifenolica, che è stata poi identificata tramite HPLC. L'estratto dei fenoli dell'olio vergine di oliva (OO-PE) conteneva 679.2 mg/g dei fenoli totali, come riportato da Montedoro et al. [18]. L'estratto fenolico derivato dalle acque di vegetazione (WW-PE) è stato ottenuto tramite un'estrazione liquido/liquido (metanolo/ acqua) da un concentrato derivato dal trattamento di filtrazione su membrana delle acque di vegetazione. L'estratto fenolico delle acque di vegetazione conteneva 572.8 mg/g di fenoli totali. La composizione fenolica degli estratti è riportata in Tabella 2.

Tab.2 Composizione chimica degli estratti fenolici derivati dall'olio d'oliva (OO-PE) e dalle acque di vegetazione (WW-PE).

	Concentrazione dei fenoli (mg/g di estratto)	
	OO-PE	WW-PE
3,4-DHPEA	8.0	48.7
3,4-DHPEA-EDA	205.7	502.1
3,4-DHPEA-EA	133.6	n.d.¹
VERBASCOSIDE	n.d.	17.7
TOTALE DEI COMPOSTI CONTENENTI 3,4-DHPEA	347.3	568.5
p-HPEA	7.1	4.3
p-HPEA-EDA	238.3	n.d.
(1)-1-ACETOSSIPINORESINOLO	86.5	n.d.
FENOLI TOTALI	679.2	572.8

n.d. non determinato

6.3 TRATTAMENTI CELLULARI

Per valutare l'effetto genotossico al DNA, le sospensioni cellulari (HL60 e PBMC) sono state trattate con i diversi epossidi (dissolti in acqua ad una concentrazione 100 volte superiore a quella testata nel terreno) in RPMI 1640 in presenza o meno di FCS (5% di FCS). Dopo una incubazione di 2 e 24h (per mantenere la vitalità cellulare al di sopra del 90% dopo 24h di trattamento, le cellule sono state trattate solo in presenza di siero) a 37°C e al 5% di CO₂, è stata valutata la vitalità con la tecnica del

trypan blue ed il danno al DNA con il Comet assay. Il range di concentrazione dei differenti epossidi usati per il trattamento delle cellule è stato determinato in base alla vitalità cellulare, che in seguito al trattamento con gli epossidi era sempre maggiore dell' 85%. Inoltre per la valutazione dell'effetto protettivo degli estratti fenolici le cellule sono state pre-incubate sia con OO-PE (1µg/ml) che con WW-PE (1µg/ml), per 30 min e poi sono stati aggiunti gli epossidi per 2 e 24 ore. E' stato anche testato l'effetto protettivo di un noto antiossidante, la N-acetil-cisteina (NAC; 10 mM) e di un enzima, la catalasi (CAT, 100 U/mL), preincubati con la sospensione cellulare 30 min prima dell'aggiunta degli epossidi. Gli estratti fenolici sono stati disciolti in una soluzione di etanolo/acqua (1/2, v:v) a 9.532 g/L per OO-PE e 5.266 g/L per WW-PE in modo tale da ottenere una concentrazione di 3,4-DHPEA e di composti contenenti il 3,4-DHPEA (3,4-DHPEA-EDA, 3,4-DHPEA-EA e Verbascoside) corrispondente a 10µmol/L. Tutti i composti puri (3,4-DHPEA-EDA, 3,4-DHPEA-EA e pHPEA, p-HPEA-EDA e Verbascoside) sono stati divisi in aliquote e conservati al buio a -20°C. I campioni sono stati scongelati appena prima dell'uso e diluiti in RPMI 1640 alla concentrazione desiderata.

Per investigare invece le proprietà anti-proliferative e pro-apoptotiche del 3,4-DHPEA le cellule HL60 sono state trattate con i seguenti composti: N-acetil-cisteina (NAC; 10 mM), ascorbato (100 µM), α-tocoferolo (10–100 µM), β-carotene (10–100 µM), catalasi (CAT, 100 U/mL), o-fenantrolina (PNT, 2.5–50 µM).

La NAC è stata preparata come soluzione stock a 0.4 M nel terreno RPMI (il pH è stato aggiustato a 7.4 con 0.2 M NaOH). α-tocoferolo e β-carotene sono stati dissolti in tetraidrofurano (THF) preparando una soluzione stock alla concentrazione di 8 e 30 mM, rispettivamente. Prima di ciascun esperimento, le aliquote sono state aggiunte al terreno di coltura per ottenere le concentrazioni indicate, mentre il controllo ha ricevuto la stessa quantità di THF, che non superava lo 0,05%. In tutti gli esperimenti, prima del trattamento con 3,4-DHPEA, le cellule sono state preincubate con i composti sopra riportati per 1h a 37°C. Dopo differenti tempi, le aliquote della sospensione cellulare sono state prelevate per i diversi saggi.

Il perossido d'idrogeno presente in soluzione 10 M, è stato diluito in acqua sterile in modo da ottenere le concentrazioni utilizzate nei diversi saggi.

6.4 ISOLAMENTO DELLE CELLULE MONONUCLEATE DA SANGUE PERIFERICO

Le cellule mononucleate (PBMC) sono state isolate da sangue periferico umano arricchito di leucociti, tramite un gradiente di densità [157]. Brevemente, i campioni di sangue (2ml) sono stati diluiti a 10ml con RPMI 1640 senza siero e sono stati piastrati sopra a 2ml di Hystopaque 1077 e poi centrifugati a 1600 rpm per 20 min. Lo strato contenente le cellule mononucleate si trova all'interfaccia tra il plasma e l'Hystopaque, è stato recuperato e lavato 2 volte con RPMI 1640. I PBMC così ottenuti vengono contati secondo la metodica del trypan blue e la densità aggiustata ad 1×10^6 cellule/ml con RPMI 1640 addizionato di siero (5%), antibiotici e glutammina, infine le cellule sono utilizzate per i diversi esperimenti. I PBMC isolati da sangue periferico umano, come detto precedentemente, sono stati sottoposti a trattamenti specifici per separare i linfociti dai monociti. In particolare questa metodica è stata messa a punto nel laboratorio in cui ho svolto la tesi di dottorato [158] secondo il seguente procedimento. I PBMC dopo essere stati contati e aggiustati alla concentrazione di 8×10^6 cellule/ml, sono stati di nuovo seminati in parte nelle fiasche da 25 cm² ed incubati per 1h e mezza a 37°C ed il 5% di CO₂ e la restante aliquota nei pozzetti (200µl ciascuno) ed incubati per 2h.

Tale incubazione permette ai monociti di aderire al fondo dei pozzetti, mentre i linfociti rimangono in sospensione. E' stato recuperato poi il sovranatante dalla fiasca contenente i linfociti, che sono stati nuovamente seminati su una piastra sterile e incubati per un'altra ora e mezza, in modo da permettere la completa aderenza dei monociti. A questo punto quindi, è possibile separare i linfociti dai monociti: i linfociti infatti, sono stati recuperati dalla fiasca, lavati 2 volte in RPMI 1640, per eliminare le piastrine eventualmente presenti, contati, e la loro concentrazione aggiustata a 0.5×10^6 linfociti/ml. Sono stati poi seminati in Eppendorf (Vol=1 ml) e in ciascuna di esse sono stati aggiunti i rispettivi reagenti e la PMA alla concentrazione di 2µM. Ai pozzetti invece, è stato tolto il sovranatante, i monociti presenti sul fondo sono stati risospesi con 200µl della miscela di linfociti, reagenti e PMA preparati nelle Eppendorf, e nuovamente incubati a 37°C e 5% di CO₂ per 1h. La presenza della PMA nel mezzo di coltura, attiverà i monociti a produrre le diverse specie reattive dell'ossigeno (ROS), le quali a loro volta agiranno sui linfociti,

inducendo danno a livello del loro DNA. Dopo tale incubazione, 100µl di sovranatante contenente i linfociti, viene utilizzato per il Comet Assay.

6.5 VALUTAZIONE DELLA PROLIFERAZIONE

6.5.1 METODO DEL TRYPAN BLUE

La proliferazione è stata valutata mediante il metodo di esclusione al trypan blue, che consiste nel prelevare un'aliquota della sospensione cellulare (10 µl) che è aggiunta ad una soluzione di Trypan Blue (90 µl, 200 mg/ml). Nel caso in cui la densità cellulare risultava troppo elevata veniva effettuata una ulteriore diluizione 1:10. Dopo 5 minuti di incubazione a temperatura ambiente, una aliquota (10 µl) di tale sospensione cellulare è stata introdotta nella camera di Burker e le cellule sono state contate usando il microscopio ottico.

6.5.2 TEST COLORIMETRICO DELL'MTT [BROMURO DI 3-(4,5-DIMETILTIAZOL-2-IL)-2,5-DIFENILTETRAZOLIO]

Per la valutazione della vitalità cellulare delle cellule HCT116, SW480, MCF-7, MDA-MB231, LNCap e PC3 è stato utilizzato il test dell'MTT [159]. Le cellule sono state seminate alla densità di 0.5×10^4 cellule/ml in piastre da 96 pozzetti. Al termine di ogni periodo di incubazione, il terreno è stato rimosso e sostituito con 100µl di una soluzione di MTT, 0.5 mg/ml in HBSS (Hank's Balanced Salt Solution). Le cellule con la soluzione di MTT sono state incubate per due ore. Al termine del periodo di incubazione l'MTT è stato rimosso e sostituito con 100 µl di soluzione di lisi costituita da 0,1M di HCl in isopropanolo allo scopo di lisare le cellule e i cristalli di formazano che si formano a seguito della riduzione mitocondriale dell'MTT. Poiché il numero di cellule presenti nei campioni è direttamente proporzionale ai valori di assorbanza letti alla lunghezze d'onda di 550nm mediante un lettore di piastra (Anthos) da questi valori si può risalire al numero di cellule presenti nel campione. I valori di assorbanze dei vari campioni sono stati corretti sottraendo da essi il valore del bianco calcolato

come la media dei valori di assorbanza di tutti i pozzetti perimetrali contenenti solo terreno. Gli effetti sulla crescita delle cellule sono stati quantificati come riduzione percentuale del valore di assorbanza del campione rispetto a quello di controllo, posto come 100.

6.6 VALUTAZIONE DELL'APOPTOSI

La percentuale di cellule apoptotiche è stata determinata sia mediante conta con il microscopio a fluorescenza, che mediante citometria a flusso come riportato in letteratura [160]. I due metodi sono descritti di seguito.

6.6.1 MICROSCOPIA A FLUORESCENZA

La determinazione dell'apoptosi mediante microscopia a fluorescenza è stata determinata prelevando 200 µl della sospensione cellulare che sono stati centrifugati a 1300 rpm per 6 minuti. Il pellet cellulare è stato quindi risospeso in 20 µl di RPMI completo a cui sono stati aggiunti immediatamente prima dell'uso l'Hoechst 33342 (4 µl/ml di RPMI prelevati da una soluzione madre di 20 µg/ml in tampone fosfato PBS: Na_2HPO_4 10mM, $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 10mM, KCL 2,7mM, NaCl 120mM, CaCl_2 0,133g/l, MgCl_2 0,1 g/l, pH finale 7.3) e ioduro di propidio (IP) (20 µl/ml di RPMI prelevati da una soluzione madre di 10 µg/ml in PBS) in RPMI 1640. Dopo 5 minuti di incubazione a temperatura ambiente, le cellule sono state esaminate al microscopio a fluorescenza (dotato di una lampada a mercurio da 50-W) munito di apposito filtro per la visualizzazione dei fluorocromi. L'Hoechst (HO) è un composto permeabile alla membrane plasmatica ed è quindi in grado di diffondere liberamente, raggiungere il nucleo e colorare di blu il DNA. Di contro, lo ioduro di propidio (IP) essendo altamente polare, non attraversa le membrane intatte ma è in grado di attraversare solo quelle danneggiate, colorando di rosso il DNA delle cellule che hanno perso la funzionalità della membrana. Di conseguenza, le cellule vive saranno identificate per mezzo dei loro nuclei intatti che si coloreranno di blu (HO) e le cellule necrotiche per mezzo dei loro nuclei intatti che si coloreranno di rosso (IP). Le cellule apoptotiche verranno identificate per mezzo dei loro nuclei frammentati, che mostreranno una colorazione blu (HO) o rossa (IP) in relazione dello stadio del processo apoptotico, precoce, se la membrana è integra, e tardivo, se la membrana ha perso la semipermeabilità. Per ogni condizione sperimentale sono stati preparati tre vetrini e sono state contate 100 cellule per ogni vetrino.

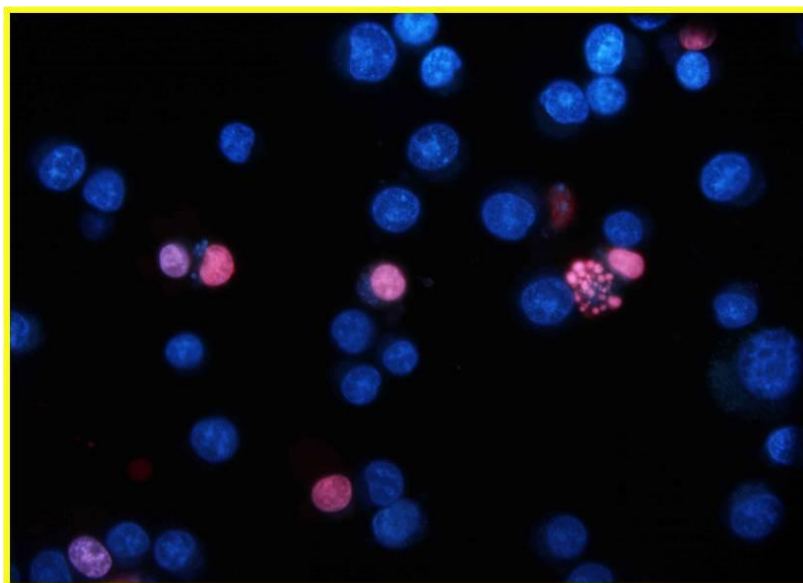


Fig.5 Immagine al microscopio a fluorescenza di cellule colorate con Ioduro di propidio (rosso) e Hoechst (blu). Cellule vive (tondeggianti blu), cellule apoptotiche precoci (margini frastagliati blu), apoptotiche tardive (margini frastagliati rossi) e necrotiche (tondeggianti rosse).

6.6.2 ANALISI DEL PICCO SUB G1

Per il saggio del Sub-G1, le cellule sono state colorate con IP come segue: $0,5 \times 10^6$ cellule sono state prelevate dalla sospensione cellulare, centrifugate a 1300 rpm per 6 minuti e quindi risospese in 10 ml di PBS. Dopo aver centrifugato nuovamente la sospensione cellulare a 1300 rpm per 6 minuti il pellet è stato risospeso in 0,5 ml di una soluzione ipotonica del fluorocromo contenente: 50 $\mu\text{g/ml}$ di IP in 0,1 % sodio citrato e 0.1% di Triton X-100. I campioni sono stati poi conservati in ghiaccio e al buio per 30 minuti e quindi la fluorescenza del IP dei singoli nuclei è stata determinata mediante citofluorimetro (FACScan).

6.6.3 SAGGIO DELL'ANNESSINA V

Per il saggio dell'Annessina V, 1×10^6 cellule sono state prelevate dalla sospensione cellulare e centrifugate a 1300 rpm per 6 minuti e risospese in 1 ml di PBS. Dopo aver centrifugato a 1200 rpm (4°C) per 15 minuti, il pellet è stato risospeso in 500 μl di

Binding Buffer 1X (componente del kit fornito dalla ditta produttrice). Da questi sono stati prelevati 100 µl per ogni campione, trasferiti nei tubi da citofluorimetro e incubati in ghiaccio e al buio per 15 minuti dopo aver aggiunto 0,5 µl della soluzione di Annessina e 5 µl della soluzione di IP (entrambe le soluzioni sono state fornite dalla ditta produttrice del kit). Al termine del periodo di incubazione, sono stati aggiunti 400 µl di Binding Buffer e dopo 30 minuti la fluorescenza delle cellule è stata determinata mediante il citofluorimetro (FACScan).

6.7 COMET ASSAY (ELETTROFORESI DI SINGOLE CELLULE SU GEL)

6.7.1 COMET ASSAY TRADIZIONALE

L'elettroforesi di singole cellule su gel è stata effettuata essenzialmente come descritto da Singh et al., [161]. Dopo il trattamento, aliquote di sospensione cellulare (50-100µl, $0.5-1.0 \times 10^5$ cell) sono state trasferite in tubi Eppendorf e centrifugate a 1300 rpm per 6 min. Il sovranante è stato eliminato ed il pellet è stato incluso in 75µl di agarosio a basso punto di fusione (0.7% in PBS) e distribuito nei vetrini convenzionali da microscopio pre-trattati con agarosio a normale punto di fusione (0.5% in PBS). I vetrini sono stati posti in una soluzione di lisi (2.5mol/L NaCl, 100mmol/L Na₂EDTA, 10mmol/L Tris-HCl pH 10 e aggiunti freschi 1% di TritonX 100 e 10% di DMSO) per 1h a 4°C. La corsa elettroforetica è stata fatta in un tampone preparato al momento dell'uso (1mmol/L Na₂EDTA, 300mmol/L NaOH, pH 13) per 20 min ad un voltaggio fisso di 25V (300 mA). Dopo l'elettroforesi i vetrini sono stati neutralizzati (0.4Mol/L Tris-HCl, pH 7.5) e colorati con bromuro d'etidio (20mg/L).

6.7.2 COMET ASSAY MODIFICATO

Il Comet modificato prevede l'utilizzo di enzimi quali la Formammido Pirimidina DNA Glicosidasi (FpG) e l'Endonucleasi III (Endo III) che rimuovono le basi

puriniche e pirimidiniche ossidate, rispettivamente. Il saggio si basa sul fatto che queste due proteine riconoscono le basi mutate grazie all'attività glicosilasica e le rimuovono grazie all'attività liasica, che taglia il filamento a livello delle basi ossidate. La rimozione di questi siti causa un più alto numero di rotture al filamento di DNA e la conseguenza è una maggiore migrazione del DNA. Quindi al termine della lisi, i vetrini che dovranno essere trattati con l'enzima, vengono lavati per tre volte con 200ml di tampone Reaction Buffer 1X (50mM Tris pH7.6, 2mM EDTA, 50mM KCl) e su ciascun vetrino sono aggiunti 50µl di enzima. Infine si incubano per 45 min a 37°C e successivamente si procede con il Comet tradizionale.

6.7.3 RILEVAZIONE DELLE COMETE E ANALISI STATISTICA

Le cellule sono analizzate 24h dopo la colorazione con il bromuro d'etidio usando il microscopio a fluorescenza (ingrandimento 400X, Zeiss, R.G.) dotato di lampada a mercurio di 50-W. Le immagini vengono rilevate al microscopio come forme circolari (DNA non danneggiato) e come forme simili a "comete" in cui il DNA ha migrato dalla testa a formare una coda (DNA danneggiato). L'estensione di ciascuna cometa è stata analizzata da un sistema di analisi computerizzato (Comet assay II, Perceptive Instruments, UK) che fra i numerosi parametri valutati dal sistema, il "tail moment" è quello più direttamente correlato al danno al DNA. Infatti il Tail Moment è definito come il prodotto dell'intensità di fluorescenza del DNA nella coda e la distanza media della sua migrazione tra la testa e la coda. Il calcolo dell'estensione del danno al DNA è basato sull'analisi di 100 comete selezionate in modo *random* da ciascun vetrino, suddiviso in 5 classi secondo quanto segue: classe 0 (t.m. < 1; no danno), classe 1 (t.m. 1-5; danno debole), classe 2 (t.m. 5-10; medio danno), classe 3 (t.m. 10-20; danno alto) classe 4 (t.m. >20; completamente danneggiato). Questi valori sono espressi in Unità Arbitrarie (A.U.) per ciascun vetrino e sono compresi in un intervallo che va da 0 (100% delle comete in classe 0) a 400 (100% delle comete in classe 4) [162].

I risultati di ciascun esperimento sono stati ripetuti almeno 3 volte usando differenti preparazioni di PBMC, e sono stati comparati usando il programma statistico one-way ANOVA. Quando l'effetto del trattamento era significativo ($p < 0.05$), i valori medi erano comparati utilizzando il metodo Tukey's post-hoc comparisons.

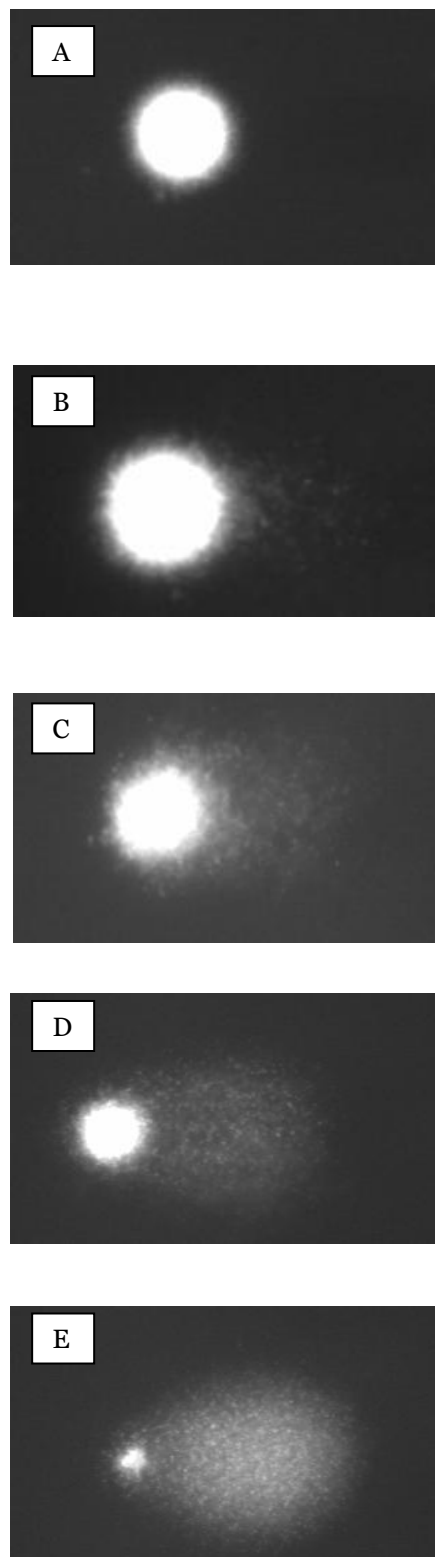


Fig 5. Rappresentazione delle diverse classi di danno al DNA: (A) Classe 0; (B) Classe I; (C) classe II, (D) classe III, (E) classe IV.

6.8 VALUTAZIONE DEI PEROSSIDI INTRACELLULARI MEDIANTE IL TEST DELLA DI-CLORO-FLUORESCINA DI-ACETATO (DCFH-DA)

I perossidi intracellulari sono stati quantificati usando la citometria a flusso (FACScan, Becton Dickinson) ed il fluorocromo 2,7-diclorofluoresceina-diacetato, (DCFH-DA). L'accumulo dei ROS intracellulari è stato monitorato con DCFH-DA, che è in grado di attraversare la membrana cellulare ed è idrolizzata da non specifiche esterasi intracellulari ad un composto non fluorescente DCFH. In presenza dei ROS, la DCFH è ossidata in un composto altamente fluorescente DCF, che emette alla lunghezza d'onda di 532 nm (FL-1). L'intensità di fluorescenza di DCFH-DA è proporzionale alla quantità di ROS intracellulari che si sono formati [163]. Brevemente, al termine del periodo d' incubazione con gli epossidi, 1×10^6 di cellule sono state prelevate da ogni campione e caricate con $20 \mu\text{M}$ di DCFH-DA ed incubate a 37°C per 30 min e al buio. In seguito al trattamento con DCFH-DA è stato anche allestito un campione contenente H_2O_2 $100 \mu\text{M}$ per 15 min come controllo positivo. Parallelamente è stato anche allestito un campione privo della DCFH-DA come controllo negativo.

Poi le cellule sono state centrifugate a 1300 rpm per 6 minuti, ed i campioni sono stati risospesi in 0.5 ml di PBS ed analizzati al citofluorimetro.

6.9 DOSAGGIO DELLA CONCENTRAZIONE DI PEROSSIDO DI IDROGENO (H_2O_2) NEI TERRENI DI COLTURA

La concentrazione dell' H_2O_2 nei terreni di coltura è stata dosata mediante il metodo dell'ossidazione degli ioni ferrosi e dello xilenolo orange [164] come segue: a $20 \mu\text{l}$ del terreno di coltura sono stati aggiunti $200 \mu\text{l}$ della miscela di reazione contenente $250 \mu\text{M}$ ammonio ferro(II) solfato, 25 mM H_2SO_4 , 100 mM sorbitolo e $125 \mu\text{M}$ xilenolo orange e incubate a temperatura ambiente per 30 minuti. L'assorbanza è stata quindi letta a 595 nm allo spettrofotometro e la concentrazione di H_2O_2 è stata ottenuta mediante una curva standard costruita aggiungendo diverse concentrazioni di H_2O_2 all'RPMI subito prima del saggio.

6.10 METODICA DEL WESTERN BLOTTING

Le HL60 sono state incubate con il 3,4-DHPEA 100 μ M, la NAC (10mM) e la CAT (100U/ml) per 24h a 37°C. Successivamente sono state contate con la metodica del trypan blue, lavate 2 volte con PBS centrifugate a 1500 rpm x 10 min ed il pellet è stato risospeso in ghiaccio in un tampone di lisi (50mM Tris, 2% sodio dodecil solfato SDS, 0.1% blue di bromofenolo, 10% glicerolo, 50mM ditiotreitolo DTT, 5 μ l/100 μ l cocktail di inibitori delle proteasi, pH 6.8) (6 x 10⁶ cellule/ 100 μ l tampone di lisi).

L'estratto citosolico è stato sonicato due volte per 20 sec, bollito 5 min, e poi i campioni proteici sono stati congelati a -20°C prima dell'uso. I campioni (10 μ l) sono stati caricati nel gel all' 8% di acrilamide/bisacrilamide, e la corsa è avvenuta a 150V costanti. In seguito il gel è stato trasferito su una membrana di nitrocellulosa per l'elettrotrasferimento (30V, overnight). Dopo il trasferimento, la membrana è stata lavata con 25 ml di TBS 1X per 5 minuti a temperatura ambiente, quindi incubata con 25 ml di Blocking Buffer per 1h a temperatura ambiente per bloccare i siti attivi della nitrocellulosa. Quindi la membrana è stata lavata 3 volte per 5 minuti con 15 ml di TBS/T ed è stata incubata con l'anticorpo primario anti-Rb opportunamente diluito (1:1000) in 10 ml di Primary Antibody Dilution Buffer in lieve agitazione overnight a 4°C. Trascorsa la notte la membrana è stata lavata 3 volte per 5 minuti con 15 ml di TBS/T ed incubata con l'anticorpo secondario (Antibody anti-rabbit HRP-linked diluito 1:2000) in 10 ml di Blocking Buffer in lieve agitazione per 1h a temperatura ambiente. Sono stati fatti ulteriori 3 lavaggi per 5 minuti con 15 ml di TBS/T ed a questo punto si è proceduto con lo sviluppo della lastra. Le proteine legate all'anticorpo sono state visualizzate attraverso il substrato LUMIGLO secondo le istruzioni del produttore.

7. RISULTATI

7.1 EFFETTI DEGLI EPOSSIDI DEI COV E DEI COMPOSTI FENOLICI SULLA INIZIAZIONE TUMORALE

7.1.1 PREVENZIONE DEL DANNO AL DNA INDOTTO DAL PEROSSIDO DI IDROGENO (H₂O₂) DA PARTE DEI COMPOSTI FENOLICI

In questa prima fase si è investigato l'effetto di fenoli purificati isolati dall'olio vergine di oliva e di estratti polifenolici provenienti sia dall'olio di oliva (OO-PE) che dalle acque di vegetazione (WW-PE), nei confronti del danno al DNA indotto dall'H₂O₂, agente ossidante utilizzato per riprodurre "in vitro" lo stress ossidativo. Il danno al DNA è stato valutato nelle linea tumorale promielocitica umana (HL60) e nelle cellule mononucleate di sangue periferico umano (PBMC), attraverso la tecnica del comet assay.

Sono stati eseguiti degli esperimenti preliminari per determinare sia la concentrazione di H₂O₂ che il tempo di esposizione delle cellule, in grado di provocare un apprezzabile effetto genotossico senza dare citotossicità. Si è trovato che le condizioni ottimali erano 40 µmol/L di H₂O₂ e 30 min di incubazione a 37°C.

L'aggiunta di concentrazioni crescenti di 3,4-DHPEA, di OO-PE e di WW-PE al terreno di coltura delle cellule durante il trattamento con H₂O₂, ha provocato una riduzione del danno al DNA dose-dipendente sia nei PBMC (Fig.6) che nelle HL60 (Fig.7). Da notare che si è osservato un effetto protettivo statisticamente significativo anche alle concentrazioni di fenoli più basse utilizzate (1 µmol/L). Inoltre le WW-PE, in assenza di H₂O₂, sono state in grado di indurre un danno al DNA di piccola entità ma comunque statisticamente significativo (Fig.7C).

Sulla base di questi dati si sono voluti confrontare gli effetti anti-genotossici di altri composti fenolici strutturalmente correlati al 3,4-DHPEA e presenti sia in OO-PE che in WW-PE alla dose di 10 µM. I risultati hanno mostrato che tali composti sono in grado di ridurre il danno al DNA causato dal H₂O₂ (Tabella 2). Indipendentemente dal tipo cellulare utilizzato, l'attività protettiva del 3,4-DHPEA-EDA era simile a quella ottenuta per il 3,4-DHPEA, mentre l'attività protettiva di 3,4-DHPEA-EA,

oleuropeina, p-HPEA, e p-HPEA-EDA era significativamente più bassa se comparata a quella del 3,4-DHPEA (Tabella 2). Infine, l'acido caffeico (CA) ed il verbascoside hanno mostrato possedere un effetto minore rispetto a quello del 3,4-DHPEA solo nelle cellule HL60 (Tabella 2).

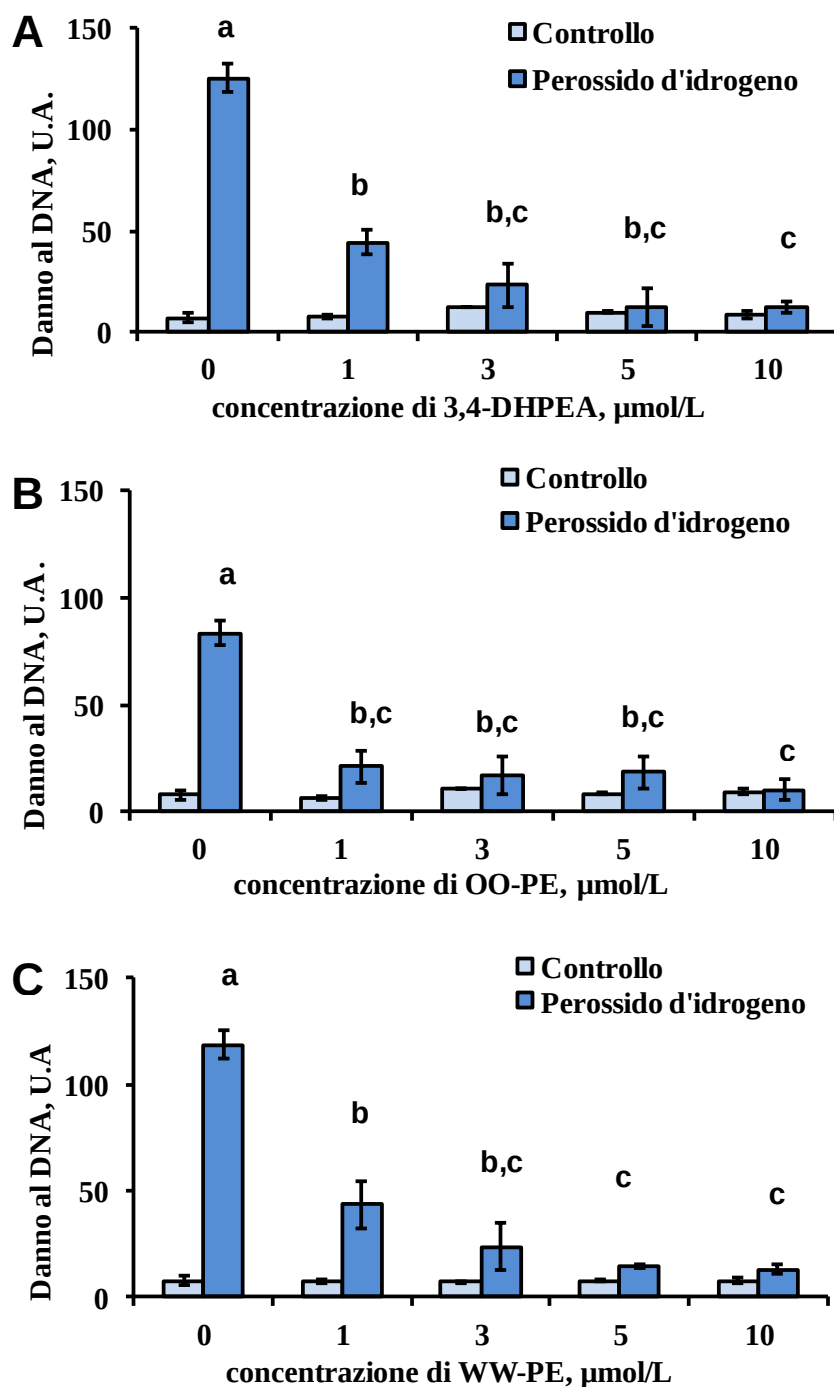


Fig.6 Effetto preventivo dei polifenoli sul danno al DNA dei PBMC indotto dal perossido di idrogeno (H_2O_2). Le cellule sono state trattate per 30 min con H_2O_2 40 μmol/L o con il veicolo (Controllo) in presenza di concentrazioni crescenti di 3,4-DHPEA (A), di OO-PE (B) e di WW-PE (C). I valori sono espressi come la media delle unità arbitrarie di danno (A.U.) $\pm$ SD, $n = 5$. I valori delle colonne senza una lettera in comune differiscono in modo statisticamente significativo, secondo il test post-hoc di Tukey, $P < 0.05$.

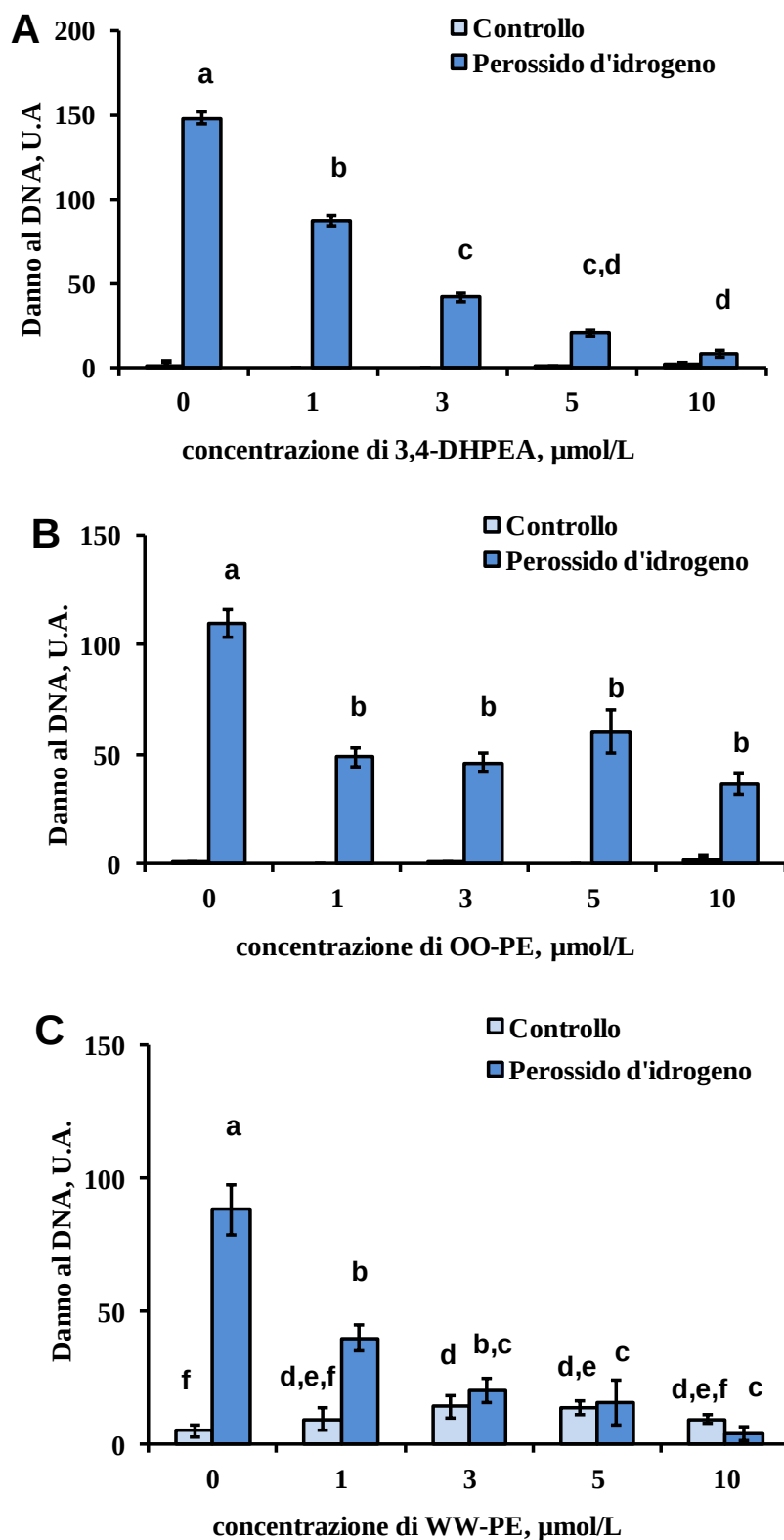


Fig.7 Effetto preventivo dei polifenoli sul danno al DNA dei HL60 indotto dal perossido di idrogeno (H_2O_2). Le cellule sono state trattate per 30 min con H_2O_2 $40\mu\text{mol/L}$ o con il veicolo (Controllo) in presenza di concentrazioni crescenti di 3,4-DHPEA (A), di OO-PE (B) e di WW-PE (C). I valori sono espressi come la media delle unità arbitrarie di danno (A.U.) $\pm$ SD, $n = 5$. I valori delle colonne senza una lettera in comune differiscono in modo statisticamente significativo, secondo il test post-hoc di Tukey, $P < 0.05$.

Tab.3 Effetto preventivo di fenoli purificati (10 $\mu\text{mol/L}$) sul danno al DNA indotto dal perossido di idrogeno(H_2O_2) (40 $\mu\text{mol/L}$) nelle cellule HL60 e nei PBMC.

RIDUZIONE DEL DANNO AL DNA (%) ¹		
COMPOSTI 10 μM	PBMC	HL60
OO-PE	97 $\pm$ 11 ^a	95 $\pm$ 9 ^a
WW-PE	95 $\pm$ 15 ^{a,b}	98 $\pm$ 7 ^a
3,4-DHPEA	90 $\pm$ 12 ^a	93 $\pm$ 4 ^a
3,4-DHPEA-EDA	83 $\pm$ 11 ^a	93 $\pm$ 5 ^a
3,4-DHPEA-EA	67 $\pm$ 15 ^{a,b}	62 $\pm$ 7 ^b
OLEUROPEINA	25 $\pm$ 2 ^{c,d}	60 $\pm$ 4 ^b
p-HPEA	23 $\pm$ 16 ^d	67 $\pm$ 15 ^b
p-HPEA-EDA	30 $\pm$ 9 ^{c,d}	65 $\pm$ 14 ^b
ACIDO CAFFEICO	50 $\pm$ 16 ^{b,c}	75 $\pm$ 8 ^b
VERBASCOSIDE	48 $\pm$ 14 ^{b,c,d}	78 $\pm$ 12 ^{a,b}

¹ I valori sono la media di $\pm$ SD, n =5. Le medie in colonna senza una lettera in comune differiscono in modo statisticamente significativo secondo il test post-hoc di Tukey, $P < 0.05$.

L'abilità dei fenoli di prevenire il danno al DNA è stata anche investigata in un sistema nel quale lo stress ossidativo è stato indotto dai monociti attivati con la PMA. I linfociti isolati di fresco sono stati coincubati con monociti (adesi sul fondo di una piastra con 96 pozzetti) stimolati o meno con 2 $\mu\text{mol/L}$ di PMA, sostanza in grado di attivare la proteina chinasi C, coinvolta nel processo di attivazione di alcuni enzimi in grado di produrre un ampio spettro di specie reattive dell'ossigeno. Dopo 1 h di incubazione a 37°C con monociti attivati da PMA ed in presenza dei differenti composti fenolici, i linfociti sono stati rimossi e saggiati per il danno al DNA (Fig.8). Sorprendentemente, in questo sistema sperimentale, il p-HPEA era più efficace che il 3,4-DHPEA nel prevenire il danno al DNA. Il 3,4-DHPEA ha provocato una riduzione del danno al DNA pari al 45% mentre l'effetto del p-HPEA è risultato pari al 69% (Fig.8).

Questi risultati suggeriscono una chiara attività antiossidante dei diversi composti polifenolici diretta contro i radicali liberi dell'ossigeno, che si esplica a concentrazioni molto basse e che possono essere verosimilmente raggiunte “in vivo”.

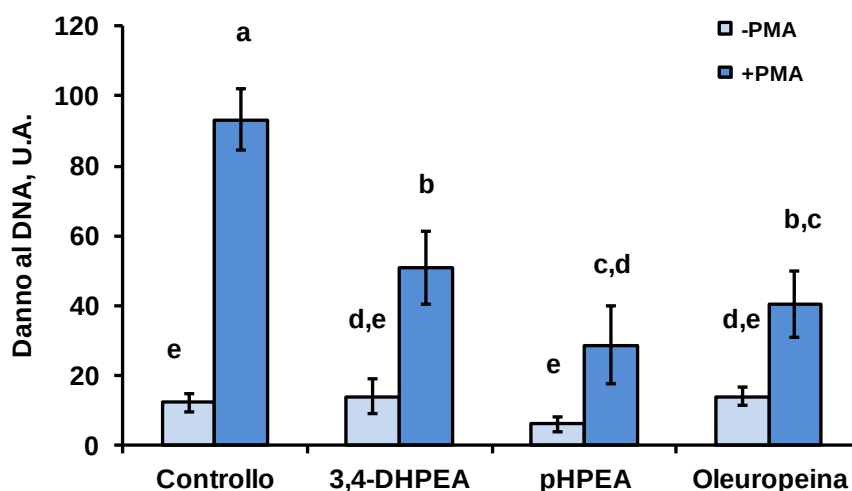


Fig.8 Effetto dell'idrossitirosolo(3,4-DHPEA),del tirosolo (p-HPEA) ed oleuropeina (10 $\mu\text{mol/L}$) sul danno al DNA di linfociti coincubati con i monociti sia non trattati che stimolati con la PMA (2 mmol/L) per 1 h. I valori sono espressi come la media delle unità arbitrarie di danno (A.U.) $\pm$ SD, n=5. I valori delle colonne senza una lettera in comune differiscono in modo statisticamente significativo, secondo il test post-hoc di Tukey, $P < 0.05$.

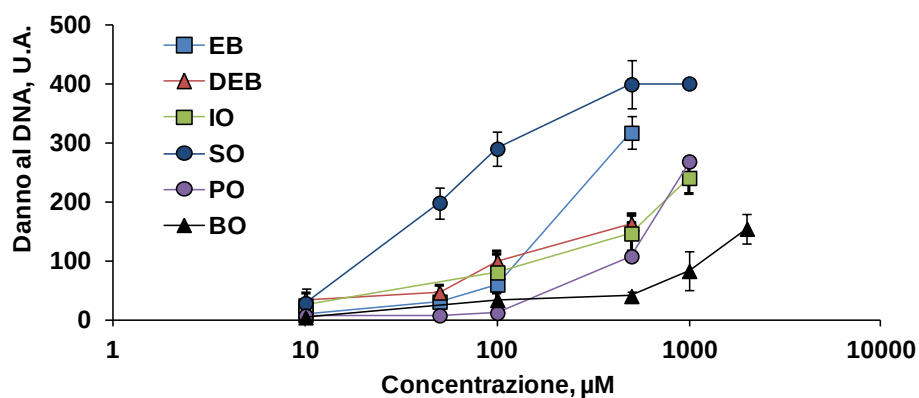
7.1.2 INDUZIONE DEL DANNO AL DNA DA PARTE DEGLI EPOSSIDI DEI COV

In questa fase dello studio si è inoltre testata l'abilità di alcuni inquinanti ambientali, quali i composti organici volatili (COV), di provocare un danno al DNA cellulare.

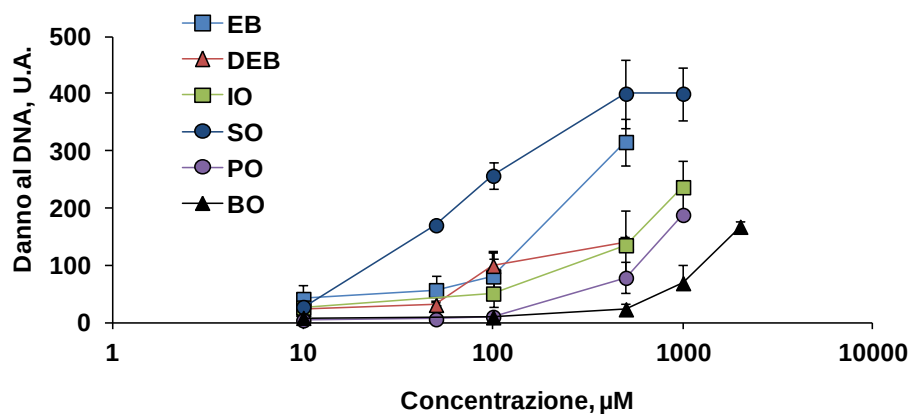
In particolare, è stato valutato il potenziale genotossico degli epossidi originati dall'1,3-butadiene (3,4-epossi-1-butano: EB; 1,2:3,4-diepossibutano: DEB); dall'isoprene (3,4-epossi-2-metil-1-butene: IO); dallo stirene (styrene-7,8-oxide: SO); dal propilene (propylene oxide: PO) e dall'1-butene (1,2-epossi-butene: BO) nei PBMC e nelle HL60 attraverso il comet assay. Gli effetti genotossici dose-dipendenti dei differenti epossidi nei confronti dei PBMC isolati di fresco e delle HL60 sono

mostrati rispettivamente nelle figure 9 e 10. L'intervallo di concentrazioni utilizzate per valutare l'effetto genotossico è stato scelto in base agli effetti citotossici dei diversi composti e in modo tale che il trattamento non riduceva significativamente la vitalità cellulare al di sotto dell'85%. Il danno al DNA è stato quantificato dopo 2h di incubazione delle cellule sia in assenza (Fig 9A e 10A) che in presenza (Fig 9B e 10B) di FCS nel terreno di coltura. Inoltre, in presenza di FCS è stato possibile estendere il tempo di esposizione fino a 24h (Fig. 9C e 10C) senza causare una riduzione della vitalità cellulare. I risultati indicano che tutti gli epossidi analizzati hanno provocato un danno al DNA dose-dipendente sia nei PBMC che nelle HL60 (Fig. 9-10).

(A)



(B)



(C)

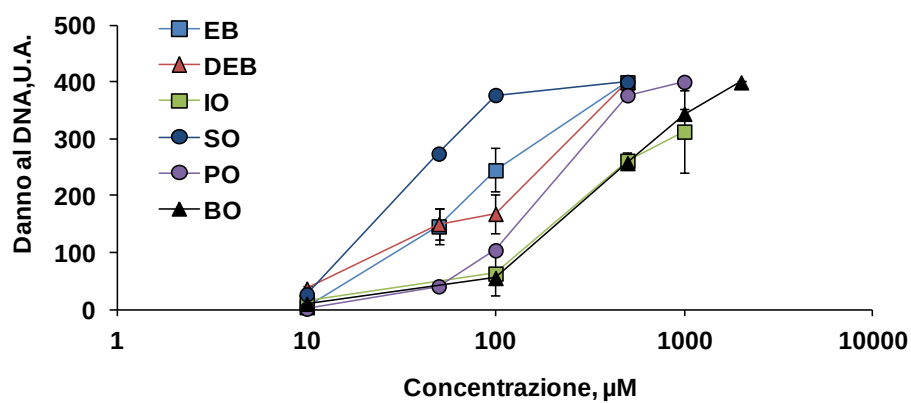
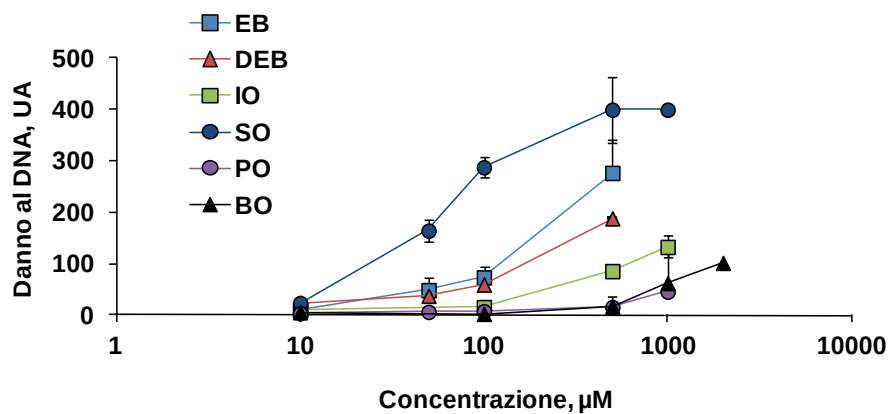
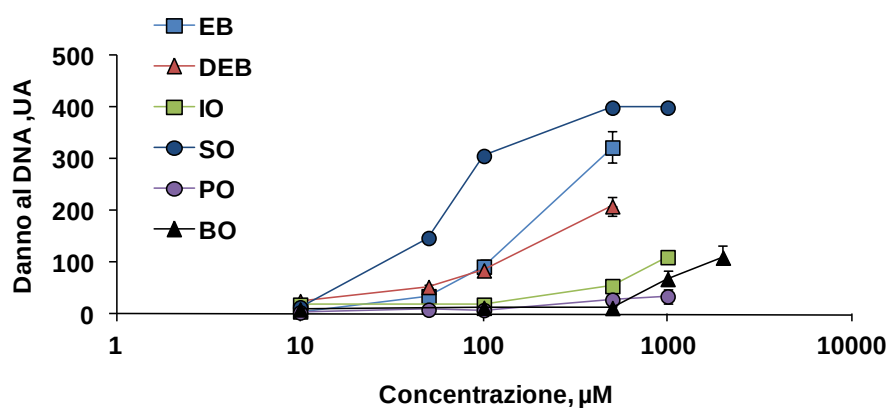


Fig.9. Danno al DNA dei PBMC indotto dai differenti epossidi dei Composti Organici Volatili (COV). Le cellule sono state incubate con concentrazioni crescenti dei composti in terreno privo di FCS a 2h (A), in terreno contenente FCS per 2h (B) e (C) per 24h. La genotossicità è stata quantificata attraverso il Comet Assay. I risultati sono la media $\pm$ S.D. dei valori delle unità arbitrarie (A.U.) di 4 esperimenti ottenuti da differenti preparazioni cellulari.

(A)



(B)



(C)

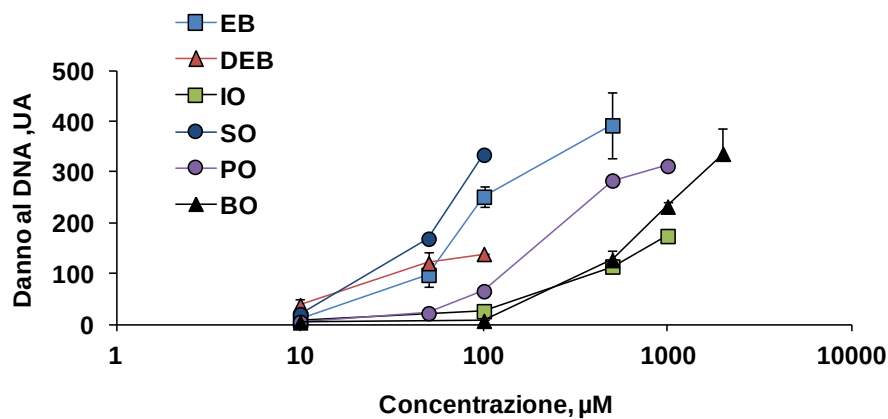


Fig.10 Danno al DNA dei PBMC indotto dai differenti epossidi di COV. Le cellule sono state incubate con concentrazioni crescenti dei composti in terreno privo di FCS a 2h (A), in terreno contenente FCS per 2h (B) e (C) per 24h. La genotossicità è stata quantificata attraverso il Comet Assay. I risultati sono la media $\pm$ S.D. dei valori delle unità arbitrarie (A.U.) di 4 esperimenti ottenuti da differenti preparazioni cellulari.

In generale, le cellule HL60 sono risultate più resistenti dei PBMC al danno al DNA indotto dai differenti epossidi e questa caratteristica è chiaramente evidente dopo trattamento con PO, che induceva un significativo danno al DNA nelle HL60 solo dopo 24h di incubazione, mentre nei PBMC si è osservato un effetto genotossico già dopo 2h di trattamento (Fig. 9).

Al fine di comparare più accuratamente il potenziale genotossico dei diversi epossidi, nella Tab. 4 sono mostrati i risultati del danno al DNA esercitato dai composti testati alla stessa concentrazione di 100µM. Da questi dati è possibile trarre le seguenti conclusioni: i) SO è risultato essere il più genotossico tra gli agenti testati mentre BO ha esercitato l'effetto minore; ii) la presenza di FCS ha un debole effetto protettivo nei confronti dei PBMC in seguito all'azione genotossica indotta da IO e BO, mentre nessun effetto è stato evidenziato per gli altri composti sia nei PBMC che nelle HL60; iii) con l'eccezione di IO, il prolungamento del tempo di esposizione da 2 a 24h ha provocato un incremento del danno al DNA; in particolare PO è risultato positivo al test solo dopo 24h; iv) dopo 2h di incubazione i due epossidi dell'1,3-butadiene (EB e DEB) hanno indotto un simile effetto genotossico, mentre dopo 24h, EB è risultato più genotossico del DEB sia nei PBMC che nelle HL60; v) la presenza del gruppo CH₃ come sostituto in R₂ (TAB.1; IO versus EB) ha fortemente ridotto la genotossicità dell'eossido dopo 24h di trattamento sia nei PBMC che nelle HL60.

In conclusione, i risultati ottenuti hanno permesso di costruire la seguente scala di genotossicità per i differenti epossidi: SO>EB>DEB>IO>PO>BO. Questa sequenza è in parziale accordo con la classificazione di cancerogenicità dei diversi composti riportata dalla Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC).

Tab. 4: Danno al DNA espresso in unità arbitrarie (U.A.) indotto dagli epossidi alla concentrazione di 100µM

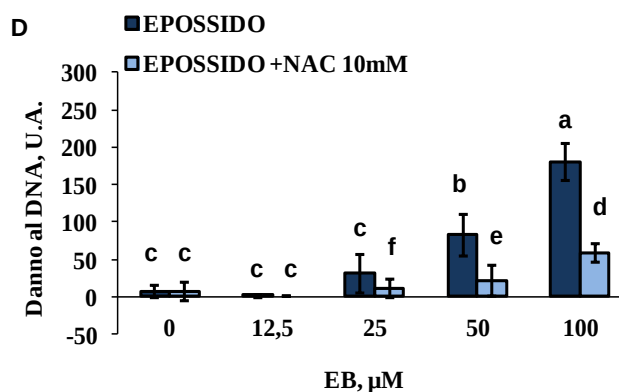
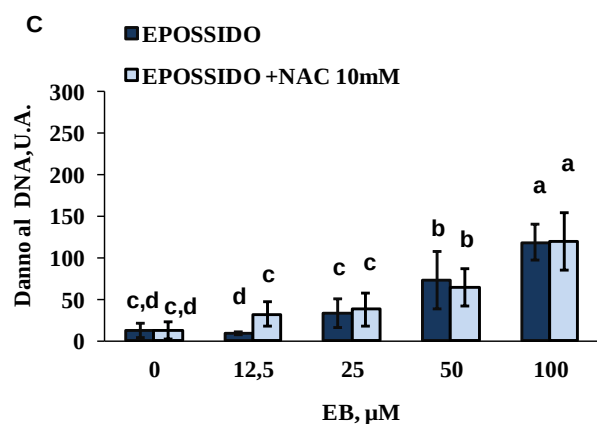
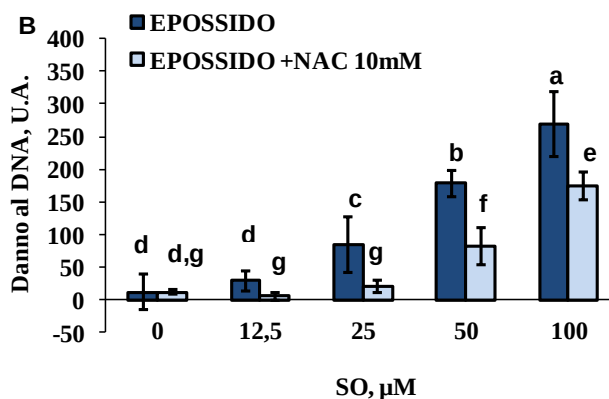
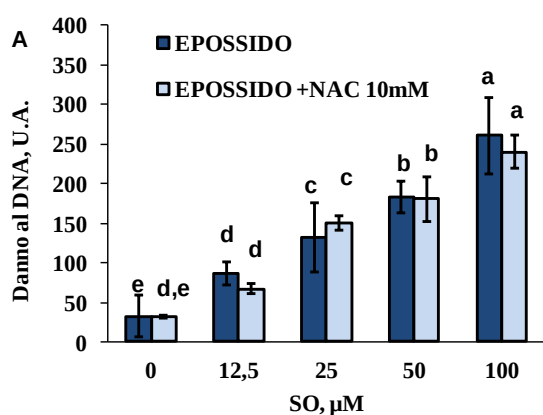
Epossidi	PBMC			HL60		
	2h		24h	2h		24h
	-FCS	+FCS	+FCS	-FCS	+FCS	+FCS
Controllo	11 ± 7 ^{D,a}	5±6 ^{C,a}	7±6 ^{F,a}	5 ± 4 ^{C,a}	3±3 ^{C,a}	6±4 ^{E,a}
EB	60 ± 12 ^{B,C,D,b}	81±30 ^{B,b}	245±24 ^{B,a}	74 ± 20 ^{B,b}	93±14 ^{B,b}	251±23 ^{B,a}
DEB	99 ± 12 ^{B,b}	99±24 ^{B,b}	168±3 ^{C,a}	60 ± 11 ^{B,c}	85±20 ^{B,b,c}	139±7 ^{C,a}
IO	80 ± 18 ^{B,C,a}	51±12 ^{B,C,b}	63±20 ^{D,E,a,b}	16 ± 3 ^{C,c}	19±4 ^{C,c}	10±6 ^{E,c}
SO	290 ± 48 ^{A,a,b}	257±60 ^{A,b}	377±16 ^{A,a}	288 ± 4 ^{A,a,b}	307±28 ^{A,a,b}	334±68 ^{A,a,b}
PO	12 ± 5 ^{D,c}	10±6 ^{C,c}	104±16 ^{D,a}	8 ± 2 ^{C,c}	9±3 ^{C,c}	65±6 ^{D,b}
BO	33 ± 14 ^{C,D,b}	9±4 ^{C,c}	75±11 ^{E,a}	3 ± 1 ^{C,c}	13±2 ^{C,c}	7±1 ^{E,c}

I valori sono la media dei valori delle U.A. ± SD di 4 esperimenti ottenuti da trattamenti cellulari differenti. Le medie senza una lettera in comune differiscono in modo statisticamente significativo, secondo il test post-hoc di Tukey, $P < 0.05$. Le lettere maiuscole si riferiscono alle comparazioni fatte entro le colonne verticali, mentre le lettere minuscole si riferiscono alla comparazione fatta tra le righe orizzontali.

7.1.3 PREVENZIONE DEL DANNO AL DNA INDOTTO DAGLI EPOSSIDI DEI COV DA PARTE DEI COMPOSTI FENOLICI

Successivamente si è esaminato se i fenoli dell'olio d'oliva e delle acque di vegetazione fossero in grado di prevenire il danno al DNA indotto dagli epossidi dei COV. Si è ipotizzato che un possibile meccanismo attraverso il quale questi composti inducevano un danno genotossico nei PBMC fosse la produzione di alcune specie reattive dell'ossigeno in grado di provocare uno stress ossidativo nella cellula. Per cui è stato utilizzato un noto antiossidante l'N-acetilcisteina (NAC), come controllo positivo, la quale agisce come sorgente di gruppi sulfidrilici e come precursore del

maggior antiossidante intracellulare il glutathione ridotto (GSH). A questo scopo le cellule sono state pre-incubate con la NAC (10mM) e OO-PE (1µg/ml) per 30 min, e successivamente sono stati aggiunti gli epossidi risultati più genotossici nello studio precedente. In particolare, si è studiato l'effetto di SO, EB e DEB dopo esposizione dei PBMC per 2 e 24 ore. In accordo con i dati precedenti, i risultati ottenuti hanno mostrato un notevole danno al DNA indotto dal trattamento con SO (Fig. 11 A e B), mentre si è osservato un minor danno per i due epossidi del butadiene, EB (Fig. 11 C e D) e DEB (Fig. 11E e F) i quali hanno evidenziato un effetto genotossico comparabile tra loro.



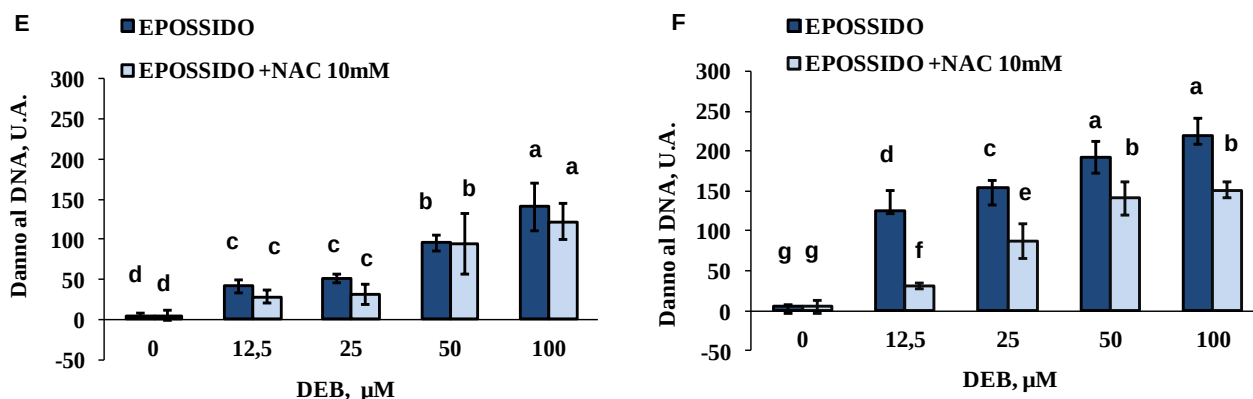


Fig.11 Effetto della N-cetil-Cisteina (NAC) sul danno al DNA causato da dosi crescenti dei differenti epossidi. I PBMC sono stati incubati con la NAC (10mM) per 30 min, poi sono stati esposti a concentrazioni crescenti degli epossidi per 2h (A-C-E) e per 24h (B-D-F). Il danno al DNA è stato valutato con il Comet Assay. I risultati sono la media $\pm$ SD dei valori delle unità arbitrarie (AU) di 4 esperimenti effettuati in differenti preparazioni cellulari. Le medie senza una lettera in comune differiscono in modo statisticamente significativo, secondo il test post-hoc di Tukey, $P < 0.05$.

Per quanto riguarda invece la protezione esercitata dalla NAC e dall'OO-PE, è necessario fare delle distinzioni in base ai tempi d'incubazione ed agli epossidi saggiati. Dopo 2h di incubazione la NAC non era in grado di proteggere in modo significativo il danno al DNA indotto dai diversi epossidi testati in tutto l'intervallo di concentrazione utilizzato (Fig. 11 A-C-E). Dall'altro lato, l'OO-PE aveva provocato una riduzione del danno al DNA con percentuali di protezione diverse a seconda dell'eossido esaminato (Fig.12). Infatti, le cellule trattate con SO avevano subito una riduzione dose-dipendente della genotossicità statisticamente significativa a tutte le concentrazioni testate (Fig.12A), mentre nel caso del danno indotto dagli epossidi del butadiene, si è osservata una protezione statisticamente significativa per EB solo alla concentrazione di 50μM (Fig.12C) e per DEB solo alle dosi più basse testate (12,5-25-50μM) (Fig.12E). Esaminando i risultati ottenuti al termine delle 24h di trattamento, si evince che il comportamento della NAC cambia completamente. Infatti, mentre il danno genotossico provocato dai tre epossidi e l'effetto protettivo esercitato da OO-PE era paragonabile a quello ottenuto dopo 2h d'incubazione (Fig. 12 B-D-F), la NAC aveva manifestato un effetto protettivo dose-dipendente e statisticamente significativo a tutte le concentrazioni testate per SO (Fig. 11B), mentre per quanto

riguarda gli altri due composti, la protezione era significativa solo alle concentrazioni più basse di EB e DEB (Fig. 11D-F).

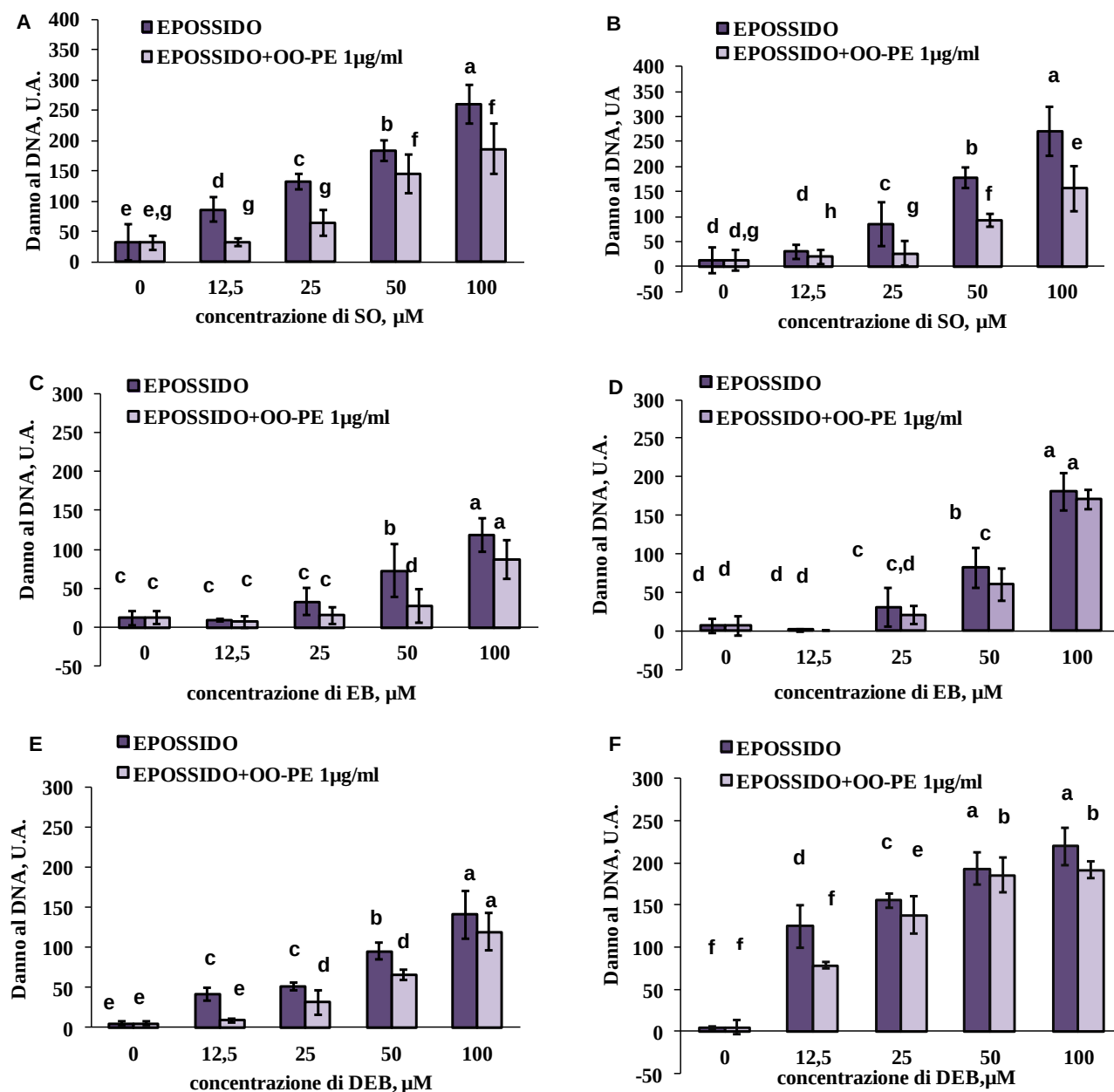


Fig.12 Effetto dell'estratto dell'olio di oliva (OO-PE) sul danno al DNA causato da dosi crescenti di differenti epossidi. I PBMC sono stati incubati con OO-PE (1µg/mL) per 30 min, poi sono stati esposti a concentrazioni crescenti degli epossidi per 2h (A-C-E) e per 24h (B-D-F). Il danno al DNA è stato valutato con il Comet Assay. I risultati sono la media $\pm$ SD dei valori delle unità arbitrarie (A.U.) di 4 esperimenti effettuati in differenti preparazioni cellulari. Le medie senza una lettera in comune differiscono in modo statisticamente significativo, secondo il test post-hoc di Tukey, $P < 0.05$.

Successivamente è stato anche investigato l'effetto protettivo di WW-PE (1µg/ml) sul danno al DNA indotto dagli epossidi sopra riportati. I PBMC sono stati incubati per 30 min con WW-PE e poi trattati con gli agenti genotossici alla concentrazione di 25µM per 2h (Fig.13). La protezione esercitata da WW-PE compresa in un intervallo di effetto che andava dal 37 al 60% (riduzione del danno al DNA) era simile a quella osservata per OO-PE (intervallo di riduzione del danno 40-55%) (Tab. 5).

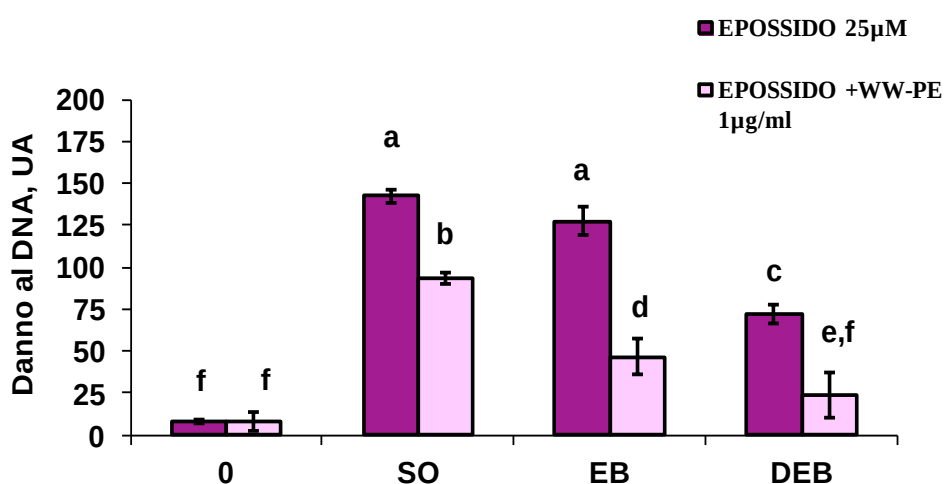


Fig.13 Effetto dell'estratto fenolico derivato dalle acque di vegetazione (WW-PE) sul danno al DNA causato dagli epossidi alla concentrazione di 25µM. I PBMC sono stati incubati con il WW-PE (1µg/ml) per 30 min, poi sono stati esposti agli epossidi per 2h. Il danno al DNA è stato valutato con il Comet assay. I risultati sono la media $\pm$ SD dei valori delle unità arbitrarie (AU) di 4 esperimenti ottenuti da differenti preparazioni cellulari. Le medie senza una lettera in comune differiscono in modo statisticamente significativo, secondo il test post-hoc di Tukey, $P < 0.05$.

Al fine di determinare se lo stress ossidativo responsabile dell'effetto genotossico causato dagli epossidi era mediato dalla formazione di perossido di idrogeno, l'esposizione dei PBMC agli epossidi è stata fatta in presenza di un enzima, la Catalasi (CAT), in grado di rimuovere il H_2O_2 trasformandolo in H_2O e O_2 . Le cellule sono state incubate quindi per 30 min con la CAT e successivamente con gli epossidi alla concentrazione di 25 µM per 2h. Al termine dell'incubazione è stato valutato il danno al DNA. Anche in questo caso, si è ottenuta una riduzione del danno che però è statisticamente significativa solo per EB e DEB (Fig.14 e Tab. 4). Questi risultati

indicano che parte del danno al DNA potrebbe essere dovuto all'accumulo di H_2O_2 nel mezzo di coltura, in quanto questo enzima non attraversa la membrana cellulare ma resta nello spazio extracellulare.

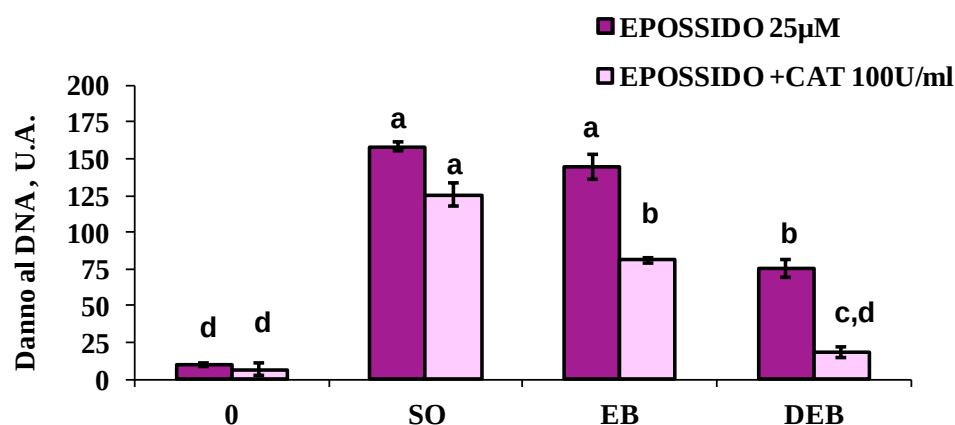


Fig.14 Effetto della Catalasi (CAT) sul danno al DNA indotto dagli epossidi. I PBMC sono stati incubati con CAT (100U/ml) per 30 min, poi sono stati aggiunti gli epossidi alla concentrazione di 25µM per 2h. Il danno al DNA è stato valutato con il Comet assay. I risultati sono la media $\pm$ SD dei valori delle unità arbitrarie (A.U.) di 4 esperimenti condotti in differenti preparazioni cellulari. Le medie senza una lettera in comune differiscono in modo statisticamente significativo, secondo il test post-hoc di Tukey, $P < 0.05$.

Tabella 5. Effetto degli estratti fenolici (OO-PE e WW-PE) e della catalasi (CAT) sul danno al DNA indotto dai diversi epossidi dopo 2h di trattamento.

	RIDUZIONE DEL DANNO, (%)*		
	CONCENTRAZIONE EPOSSIDI, 25µM		
	SO	EB	DEB
OO-PE 1µg/ml	52±1.9 ^{b,c}	55±6.5 ^{b,c}	40±2.2 ^c
WW-PE 1µg/ml	37±9.1 ^c	60±12 ^{a,b}	59±9.2 ^b
CAT 100U/ml	21±2.8 ^d	76±4.24 ^a	44±2.2 ^c

* Le percentuali sono state calcolate fissando un danno pari al 100% causato dal trattamento con il solo epossido. I valori sono le medie $\pm$ SD di 4 esperimenti. Le medie senza una lettera in comune differiscono in modo statisticamente significativo, secondo il test post-hoc di Tukey, $P < 0.05$.

Come ulteriore conferma che il danno al DNA indotto dagli epossidi dei COV era mediato dalla generazione di uno stress ossidativo, è stato utilizzato il “saggio delle comete modificato” in cui il DNA nel gel viene digerito da due enzimi [(pirimidine-FpG e Endonucleasi III)] che rimuovono le basi ossidate. La rimozione di queste basi causa un incremento delle rotture al filamento di DNA ed una maggiore migrazione del DNA stesso. Come atteso, il trattamento con i due enzimi provocava un aumento del danno al DNA indotto dagli epossidi, suggerendo la presenza di basi pirimidiniche e puriniche ossidate. Come ci si aspettava l'addizione di OO-PE ha ridotto efficientemente il danno ossidativo al DNA sia dopo 2h che 24h di incubazione (Fig 15).

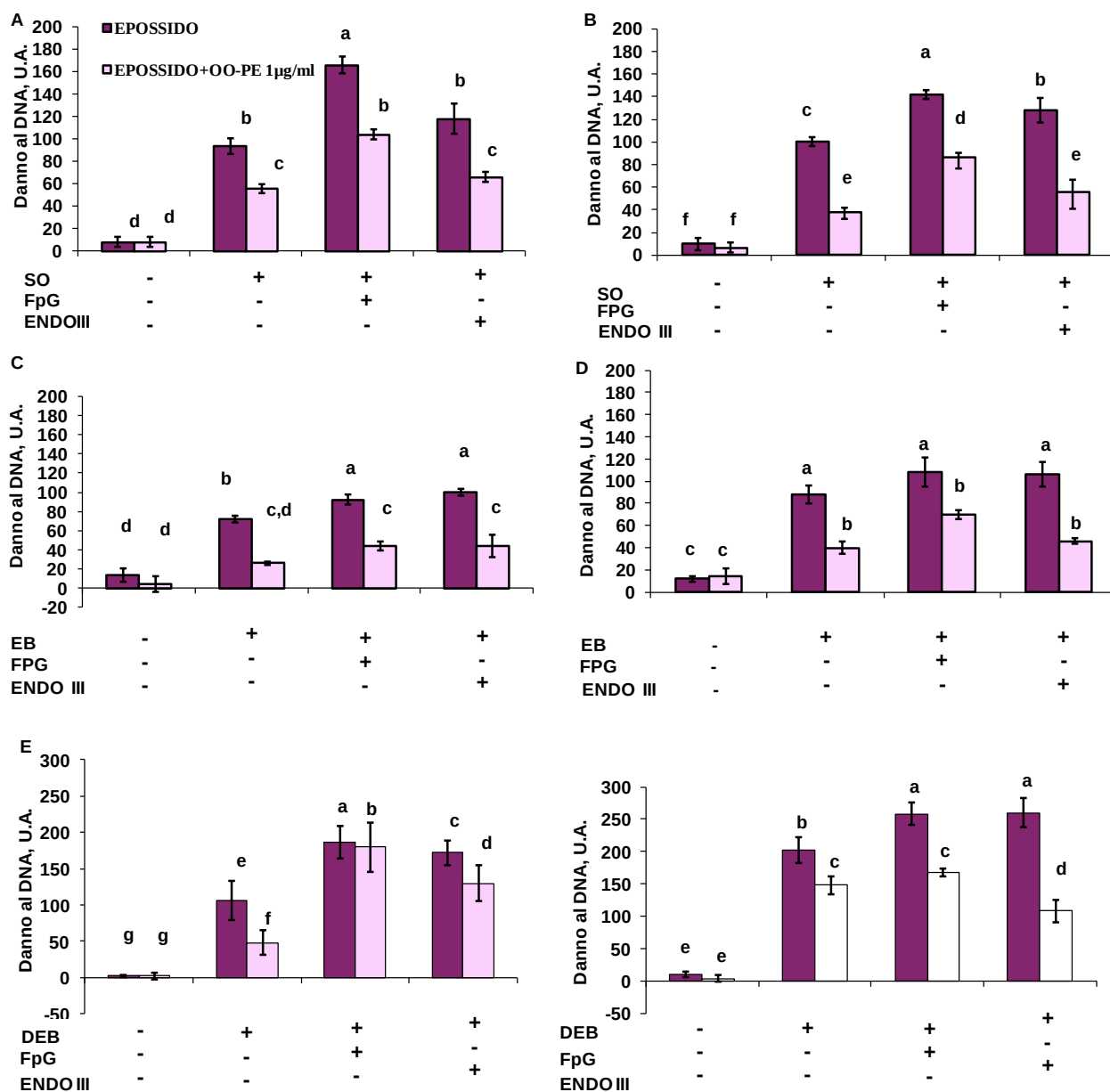
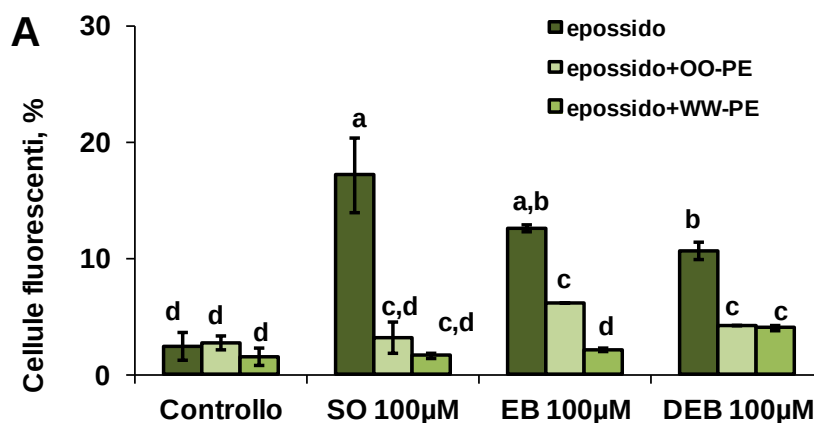


Fig.15 Danno ossidativo al DNA dei PBMC indotto dagli epossidi ed effetto preventivo dell'estratto dell'olio di oliva (OO-PE). I PBMC sono stati incubati con OO-PE (1µg/mL) per 30 min , poi sono stati esposti agli epossidi alla concentrazione di 25 µM per 2h (A-C-E) e per 24h (B-D-F). Il danno al DNA è stato valutato con il Comet Assay modificato. I risultati sono la media $\pm$ SD dei valori delle unità arbitrarie (AU) di 4 esperimenti effettuati in differenti preparazioni cellulari. Le medie senza una lettera in comune differiscono in modo statisticamente significativo, secondo il test post-hoc di Tukey, $P < 0.05$.

Infine, è stata valutata la produzione di perossidi intracellulari in cellule trattate con gli epossidi dei COV. I perossidi intracellulari sono stati quantificati usando il fluorocromo diclorofluorisceina-diacetato (DCFH-DA) e la citometria a flusso. I risultati ottenuti hanno dimostrato che il trattamento con SO ha causato un incremento della fluorescenza in un alto numero di cellule rispetto agli altri epossidi esaminati e la presenza degli estratti fenolici ha inibito completamente tale effetto (Fig. 16). Tutti questi risultati suggeriscono che parte del danno al DNA indotto dagli epossidi dei COV sia dovuto ad un meccanismo ossidativo che potrebbe essere prevenuto dalle proprietà antiossidanti dei fenoli dell'olio d'oliva. In particolare, nel caso del SO si può ipotizzare che ci sia un coinvolgimento di H_2O_2 prodotto a livello citoplasmatico come dimostrato della maggior formazione di perossidi intracellulari, mentre nel caso del EB e del DEB il danno cellulare potrebbe essere causato da H_2O_2 prodotta nello spazio extracellulare, come dimostrato dalla CAT.



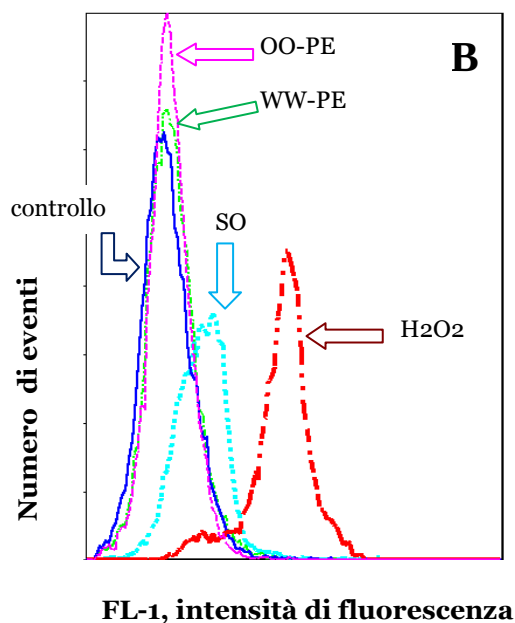


Fig. 16 (A) Produzione di perossidi intracellulari da parte degli epossidi ed effetto protettivo di OO-PE e WW-PE. I PBMC sono stati incubati con OO-PE e WW-PE per 30 min, poi sono stati aggiunti gli epossidi alla concentrazione di 100 μ M per 2h. I perossidi intracellulari sono stati quantificati usando il probe diclorofluoresceina diacetato ed il citofluorimetro a flusso. I risultati sono la media $\pm$ SD della percentuale di cellule fluorescenti ottenuti da 4 esperimenti effettuati in differenti preparazioni cellulari. Le medie senza una lettera in comune differiscono in modo statisticamente significativo, secondo il test post-hoc di Tukey, $P < 0.05$. (B) Distribuzione della fluorescenza di cellule non trattate (controllo, linea blu), trattate con SO 100 μ M (linea celeste), SO+WW-PE (linea verde), SO+OO-PE (linea rosa) e H₂O₂ (linea rossa) per 2h mediante l'analisi al citofluorimetro. La figura mostra il risultato di 1 esperimento, che è rappresentativo di 3 con risultati simili.

Nella seconda parte del lavoro di tesi invece si è approfondito lo studio dei meccanismi indotti dai polifenoli dell'olio ed in particolare dal 3,4-DHPEA, sulle due fasi successive del processo di cancerogenesi, la promozione e la progressione tumorale.

7.2 VALUTAZIONE DELL'EFFETTOANTI-PROMOZIONE/PROGRESSIONE TUMORALE DELL'IDROSSITIROSOLO

7.2.1 INIBIZIONE DA PARTE DELLA NAC DELL'EFFETTO ANTI-PROLIFERATIVO E PRO-APOPTOTICO DELL'IDROSSITIROSOLO (3,4-DHPEA)

In precedenti lavori effettuati nel laboratorio in cui è stata svolta questa tesi, è stato dimostrato in maniera esauriente, l'effetto anti-proliferativo, pro-apototico ed inibitorio sul ciclo cellulare indotto dal 3,4-DHPEA (100 μ M) in diversi tipi cellulari, quali le cellule derivate dal tumore al colon (HT-29) e dalla leucemia promielocitica umana (HL-60) [82,83].

In questo studio di dottorato quindi, si è cercato di individuare i meccanismi coinvolti negli effetti sopra riportati. L'effetto della NAC sull'attività anti-proliferativa del 3,4-DHPEA (100 μ M) è stato valutato al fine di investigare il possibile coinvolgimento dei ROS. In particolare, le cellule HL60 sono state preincubate per 1 h con la NAC e poi è stato aggiunto il 3,4-DHPEA e la proliferazione cellulare è stata seguita per 96h. Lo studio della vitalità cellulare, misurata ogni 24 ore, ha mostrato che la NAC era in grado di restaurare la proliferazione cellulare ad un valore pari a circa il 50% del valore del controllo (Fig. 17A). Inoltre, l'aggiunta della NAC nel terreno di coltura ha inibito effettivamente l'apoptosi indotta dal 3,4-DHPEA nelle cellule HL60 dopo 24h di trattamento, come evidenziato dall'analisi dell'apoptosi mediante il microscopio a fluorescenza (Fig. 17B). Tale attività inibitoria è stata anche confermata dalla quantificazione dell'apoptosi sia attraverso l'analisi della frammentazione del DNA dimostrata dalla comparsa del picco in Sub-G1 (Fig. 18C), che dall'esternalizzazione della fofatidil-serina come evidenziato dal metodo della doppia colorazione con FITC-coniugata all'annessina-V e PI (Fig. 18D). Questi risultati hanno permesso di formulare una prima ipotesi riguardo il possibile coinvolgimento dello stress ossidativo nei meccanismi alla base degli effetti anti-proliferativi e pro-apoptotici causati dal trattamento delle cellule tumorali con elevate dosi di 3,4-DHPEA.

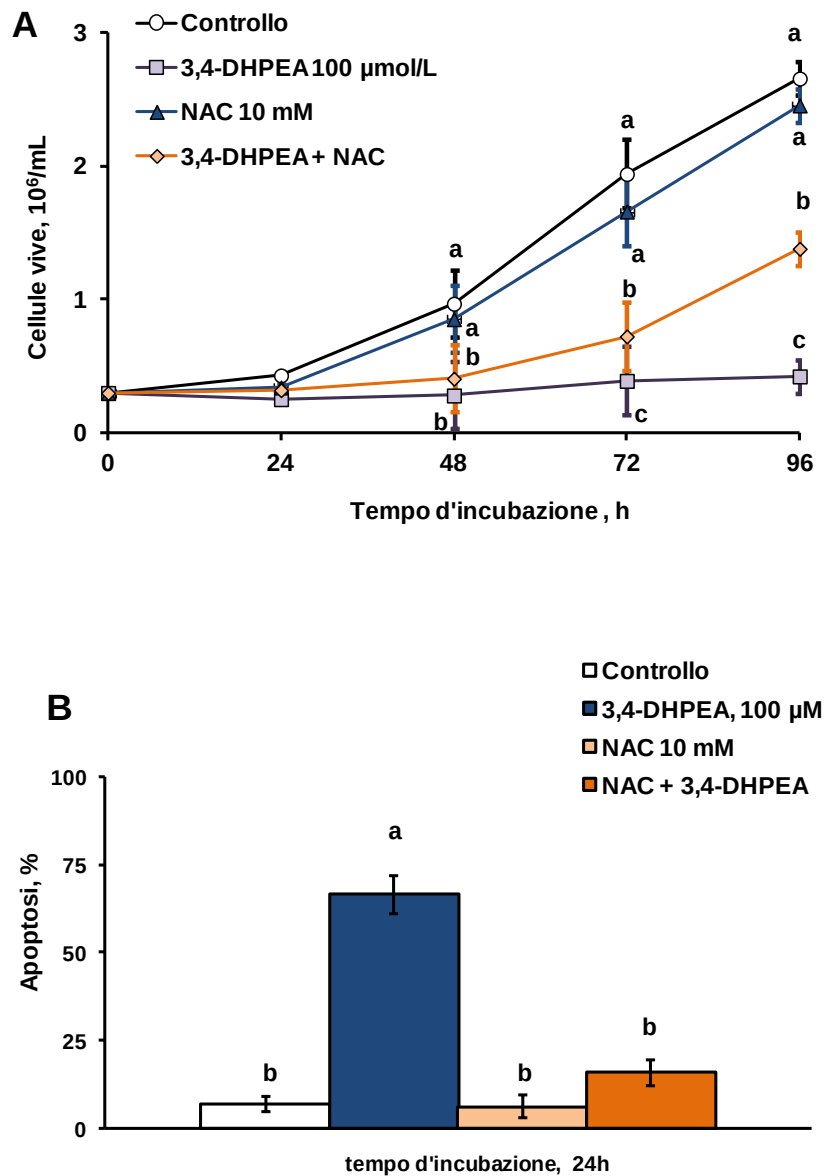


Fig.17 Effetto della NAC sugli effetti anti-proliferativi e pro-apoptotici del 3,4-DHPEA nelle cellule HL60. (A) Le cellule sono state seminate a $0,2 \times 10^6/\text{ml}$ in terreno completo in assenza (controllo) ed in presenza di 3,4-DHPEA ($100 \mu\text{M}$), NAC (10mM) e 3,4-DHPEA più NAC; la vitalità è stata monitorata nel tempo con il tripan blu. (B) Le cellule sono state incubate per 24h in terreno completo in assenza (controllo) ed in presenza di 3,4-DHPEA ($100 \mu\text{M}$), NAC (10mM) e 3,4-DHPEA più NAC e la percentuale di cellule apoptotiche è stata determinata mediante il microscopio a fluorescenza. I dati rappresentano la media $\pm$ SD di 3 differenti esperimenti. Punti e barre con lettere diverse differiscono in modo statisticamente significativo, secondo il test post-hoc di Tukey $P < 0.05$.

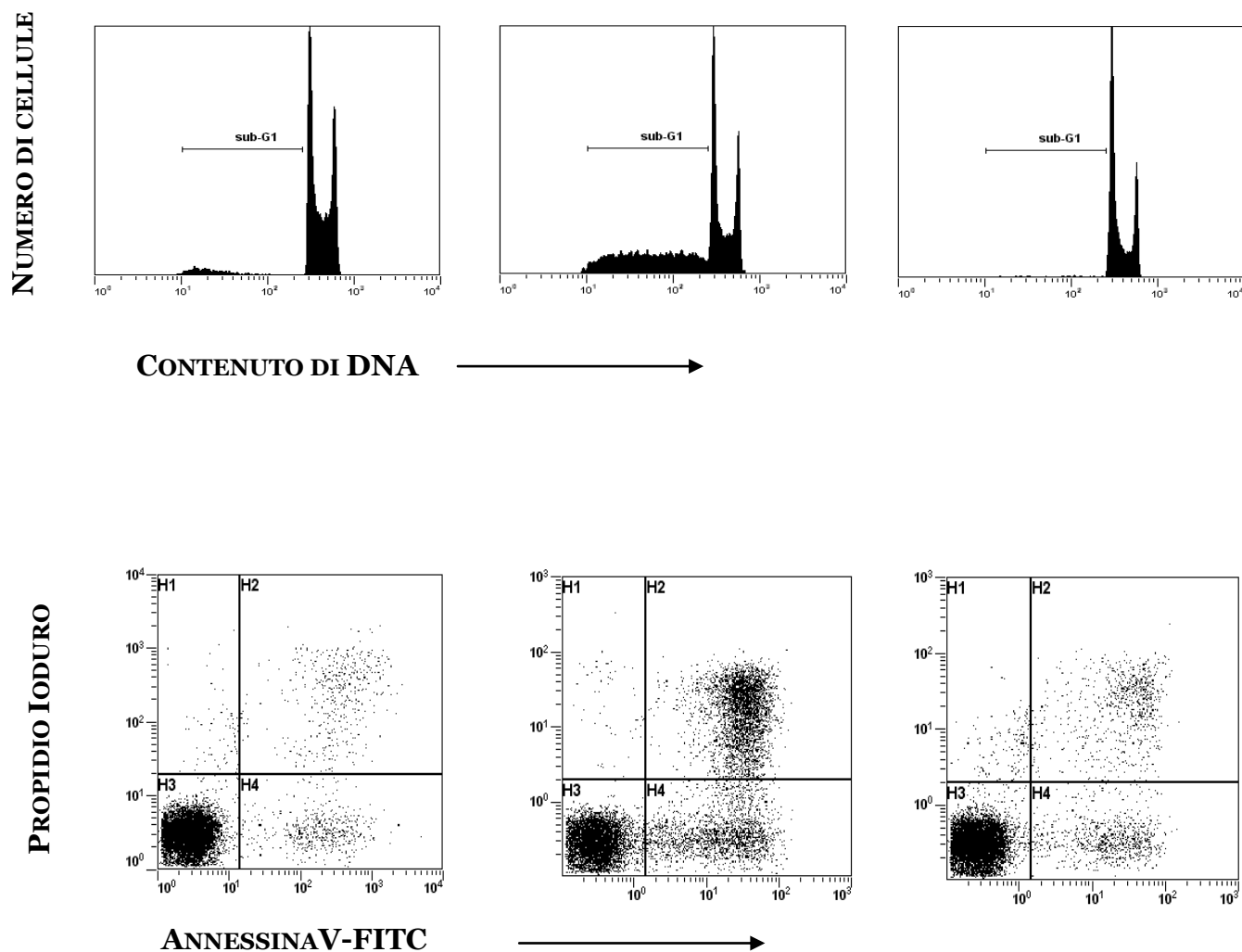


Fig.18 Effetto della N-Acetil-cisteina (NAC) sull'apoptosi indotta dal 3,4-DHPEA nelle cellule HL60. Le cellule ($0.25 \times 10^6/\text{mL}$) sono state incubate in RPMI completo per 24h in assenza (controllo) ed in presenza del 3,4-DHPEA ($100 \mu\text{M}$) e 3,4-DHPEA più NAC (10 mM) e la percentuale di cellule apoptotiche è stata determinata mediante citofluorimetro a flusso sia dopo colorazione con PI (A) che annessina V-FITC (B). Nella figura sono mostrati i dati ottenuti da un singolo esperimento rappresentativo di 3 che hanno prodotto simili risultati.

7.2.2 EFFETTO DI NOTI ANTIOSSIDANTI NATURALI SULL'APOPTOSI INDOTTA DAL 3,4-DHPEA

Per confermare l'ipotesi secondo la quale il 3,4-DHPEA è in grado di indurre la formazione di radicali liberi responsabili del processo apoptotico, sono stati utilizzati anche degli antiossidanti che regolarmente vengono assunti con la dieta e presenti in alimenti di origine naturale, quali il β -carotene, l' α -tocoferolo e l'ascorbato. L'ascorbato, testato alla stessa concentrazione del 3,4-DHPEA (100 μ M), è stato in grado di ridurre efficientemente l'apoptosi indotta dal 3,4-DHPEA (Tabella 5). L' α -tocoferolo invece, alla concentrazione di 100 μ M, non ha cambiato significativamente né il numero di cellule apoptotiche né quelle necrotiche, mentre alla concentrazione di 10 μ M ha provocato un effetto protettivo simile a quello osservato per l'ascorbato a 100 μ M (Tabella 6). Un comportamento completamente differente è stato ottenuto con il β -carotene, che si è dimostrato altamente tossico alla concentrazione di 100 μ M sia in presenza che in assenza del 3,4-DHPEA (Tabella 6). Utilizzando una concentrazione inferiore e pari a 10 μ M, il β -carotene è risultato debolmente pro-apoptotico quando presente singolarmente nella sospensione cellulare, mentre in combinazione con il 3,4-DHPEA ha provocato un piccolo effetto inibitorio sull'apoptosi indotta da quest'ultimo, sebbene questo effetto non era statisticamente significativo.

In conclusione questi risultati rafforzano ulteriormente l'ipotesi che l'apoptosi indotta dal 3,4-DHPEA sia mediata da un'iperproduzione di ROS.

Tab.6 Effetto di diversi antiossidanti sulla percentuale di cellule HL-60 necrotiche e apoptotiche dopo trattamento senza (controllo) e con 3,4-DHPEA alla concentrazione di 100µM per 24h.

		Controllo	Ascorbato	α -Tocoferolo		β -Carotene	
			100 µM	100 µM	10 µM	100 µM	10 µM
Controllo	Necrosi	0.5±0.2 ^{B,b}	1.4±0.4 ^{B,b}	1.5±1.3 ^{B,b}	N.D. ¹	77.0±6.0 _{A,a}	0.7±1.0 ^{C,b}
	Apoptosi	2.5±1.0 ^{B,c}	2.7±0.9 ^{B,c}	5.5±0.6 ^{B,c}	4.3±1.8 ^{B,c}	20.7±5.0 _{B,a}	15.0±2.8 ^{B,b}
3,4-DHPEA	Necrosi	0.5±0.5 ^{B,b}	1.0±0.5 ^{B,b}	1.0±0.8 ^{B,b}	N.D.	91.0±2.0 _{A,a}	2.5±0.7 ^{C,b}
	Apoptosi	43.2±5.0 ^{A,b}	17.2±6.0 ^{A,c}	54.5±6.0 ^{A,a}	18.2±6.5 ^{A,c}	8.0±1.4 ^{B,c}	35.0±7.0 ^{A,b}

n.d., non determinato. I valori sono le medie $\pm$ SD di 5 esperimenti. Le medie senza una lettera in comune differiscono in modo statisticamente significativo, secondo il test post-hoc di Tukey $P < 0.05$. Le lettere maiuscole si riferiscono alla comparazione avvenuta tra le colonne, mentre le lettere minuscole si riferiscono alla comparazione effettuata tra le righe.

7.2.3 COINVOLGIMENTO DI H_2O_2 NELL'APOPTOSI INDOTTA DAL 3,4-DHPEA

Quindi si è cercato di capire quali fossero le specie reattive dell'ossigeno coinvolte nel processo apoptotico indotto dal 3,4-DHPEA. Si è ipotizzata la presenza sia di H_2O_2 e del radicale idrossile ($OH\cdot$), derivato dal H_2O_2 stessa attraverso la reazione di Fenton Fe(II)-dipendente. Per valutare se queste specie reattive erano realmente coinvolte nell'effetto apoptotico indotto dal 3,4-DHPEA, le cellule HL60 sono state esposte al 3,4-DHPEA in presenza di CAT (100 U/mL) e di un composto in grado di chelare il Fe(II), la PNT (50 µM). I risultati mostrati in Fig. 19A indicano che l'apoptosi è stata effettivamente prevenuta dalla CAT, mentre la PNT non ha prodotto alcun effetto. E' da sottolineare comunque che la stessa PNT era in grado di indurre l'apoptosi nelle cellule HL60 indipendentemente dalla presenza del 3,4-DHPEA. Per ovviare a questo problema sono state utilizzate dosi più basse di PNT (10-2.5 µM) le quali hanno mostrato un minor effetto pro-apoptotico che è risultato trascurabile alla dose più

bassa (2,5 μM). Ad ogni modo anche alle dosi più basse la PNT non è stata in grado di inibire l'apoptosi indotta dal 3,4-DHPEA (Fig. 19C).

Da questi risultati si evince quindi, che il composto primariamente responsabile dell'induzione dell'apoptosi da parte del 3,4-DHPEA, è il H_2O_2 .

Inoltre, dato che la CAT non è permeabile alla membrana cellulare, questi risultati suggeriscono che la produzione del perossido d'idrogeno potrebbe avvenire nello spazio extracellulare.

Per testare questa ipotesi è stata misurata la concentrazione di H_2O_2 nel terreno di coltura delle cellule HL60 dopo 24h di incubazione con 3,4-DHPEA. Come dimostrato in Fig. 19B, il 3,4-DHPEA ha provocato un evidente accumulo di H_2O_2 nel terreno di coltura che è stato totalmente rimosso dalla CAT. In contrasto, la PNT non ha modificato significativamente l'accumulo di H_2O_2 nel terreno di coltura delle HL60 sia quando testata a 50 μM (Fig. 19B) che alle concentrazioni più basse (Fig. 19D). Questi risultati confermano l'ipotesi iniziale e cioè che l'effetto pro-apoptotico del 3,4-DHPEA sia mediato dal rilascio di H_2O_2 nel terreno di coltura delle cellule.

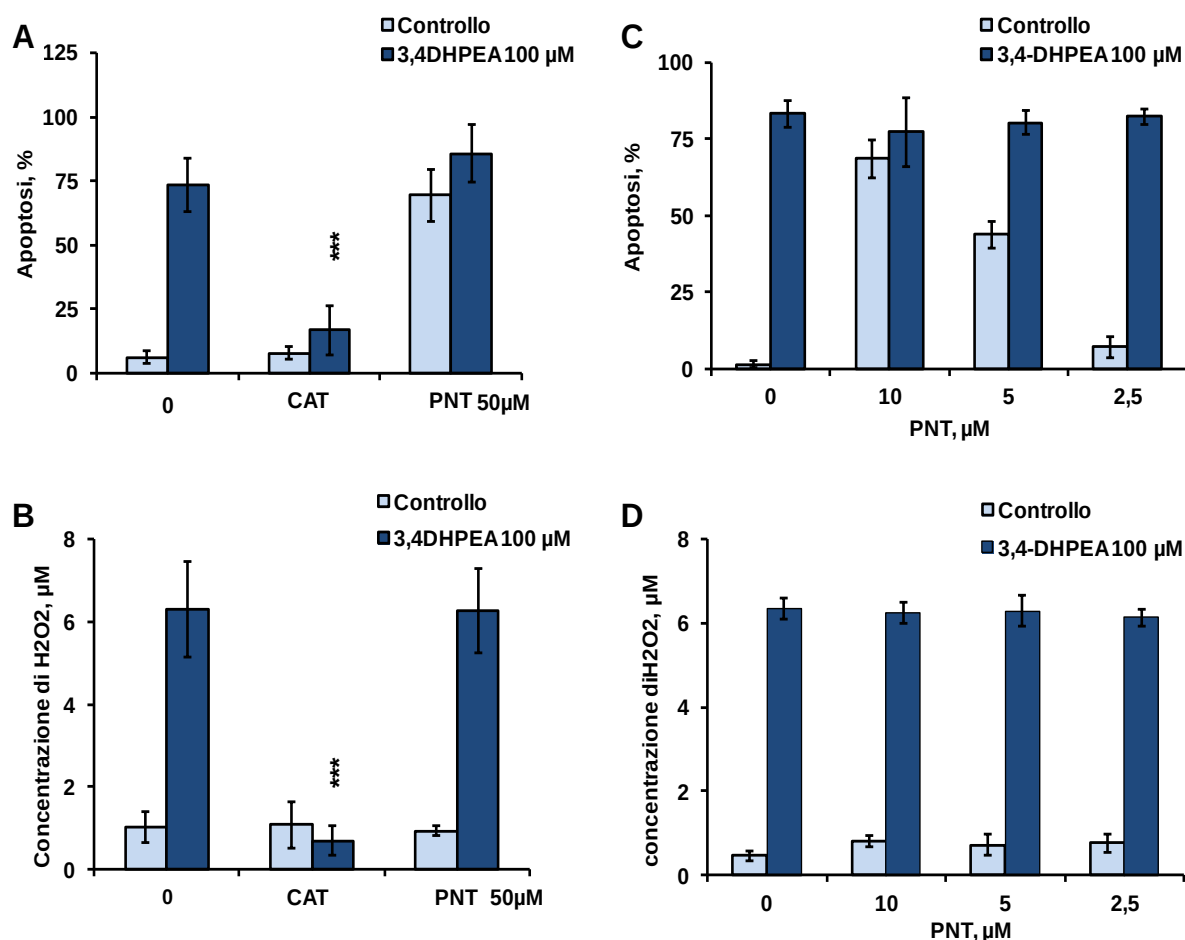


Fig. 19 Effetti della Catalasi (CAT) e della Fenantrolina (PNT) sull'apoptosi indotta dal 3,4-DHPEA (A e C) e sulla produzione del H₂O₂ (B e D). Le cellule (0.25×10^6 /mL) sono state trattate con e senza 3,4-DHPEA (100 μM) in terreno RPMI per 24h in assenza ed in presenza di CAT (100 U/mL, A e B) e PNT (50 μM, A e B; 2.5–10 μM C e D). La percentuale di cellule apoptotiche è stata valutata mediante il microscopio a fluorescenza (A e C) mentre la concentrazione di H₂O₂ nel terreno di coltura è stata determinata con il metodo dell'ossidazione degli ioni ferrosi e dello xilenolo orange (B e D). I dati rappresentano la media ± SD di tre esperimenti differenti *** $p < 0.001$ comparato agli effetti del 3,4-DHPEA in assenza di CAT.

Per essere certi che il rilascio di H₂O₂ da parte del 3,4-DHPEA non fosse condizionato da eventuali attività enzimatiche presenti nel siero e/o nelle cellule, l'accumulo dell'H₂O₂ è stato misurato sia nel terreno di coltura tal quale che nel terreno arricchito di siero in presenza e in assenza di cellule. Gli esperimenti sono stati condotti aggiungendo il 3,4-DHPEA (100 μM) al terreno di coltura e incubandolo per 1h, 6h e 24h prima della rilevazione dell' H₂O₂. I risultati riportati in Fig. 20A hanno dimostrato che il massimo accumulo di H₂O₂ si è osservato nel terreno privo di cellule

e di siero, mentre la presenza sia del siero che delle cellule, ha ridotto la concentrazione di H_2O_2 ; in particolare, le HL60 hanno ridotto drasticamente l'accumulo di H_2O_2 nel terreno di coltura dopo 24h di incubazione.

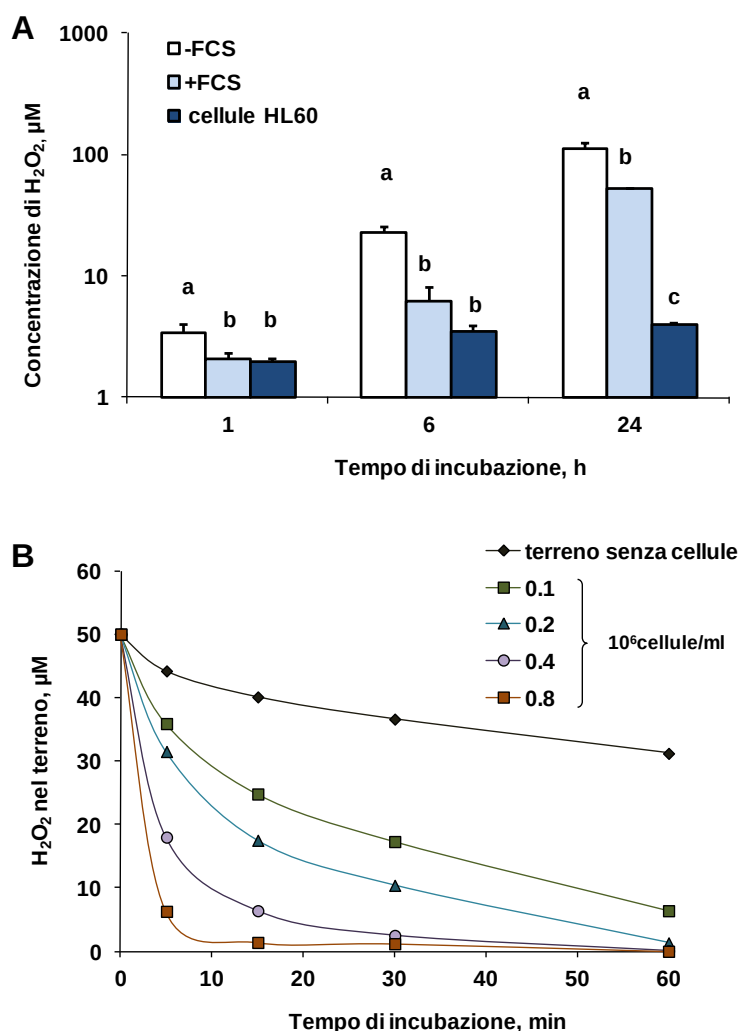


Fig.20 Accumulo del H_2O_2 nel terreno di coltura in diverse condizioni sperimentali (A). Il 3,4-DHPEA ($100 \mu M$) è stato aggiunto al terreno RPMI sia privato di FCS (-FCS) che contenente solo FCS (+FCS) e FCS + cellule HL60 alla densità di $0.2 \times 10^6 / mL$ (cellule HL60). Dopo 1h, 6h e 24h di incubazione la concentrazione di H_2O_2 nel mezzo di coltura è stata determinata con il metodo dell'ossidazione degli ioni ferrosi e dello xilenolo orange. I dati rappresentano la media $\pm$ SD di tre esperimenti indipendenti. Le barre con una lettera diversa differiscono in modo statisticamente significativo secondo il test post-hoc di Tukey, $P < 0.05$. Eliminazione del H_2O_2 da parte delle cellule HL60 (B). Il H_2O_2 esogeno è stato aggiunto al terreno alla concentrazione di $50 \mu M$ in presenza di differenti densità cellulari (0.1×10^6 - $0.8 \times 10^6 / mL$) ed incubato a $37^\circ C$. A diversi tempi è stata misurata la concentrazione di H_2O_2 nel terreno di coltura attraverso il metodo dell'ossidazione degli ioni ferrosi e dello xilenolo orange. I dati rappresentano la media $\pm$ SD di 3 esperimenti differenti.

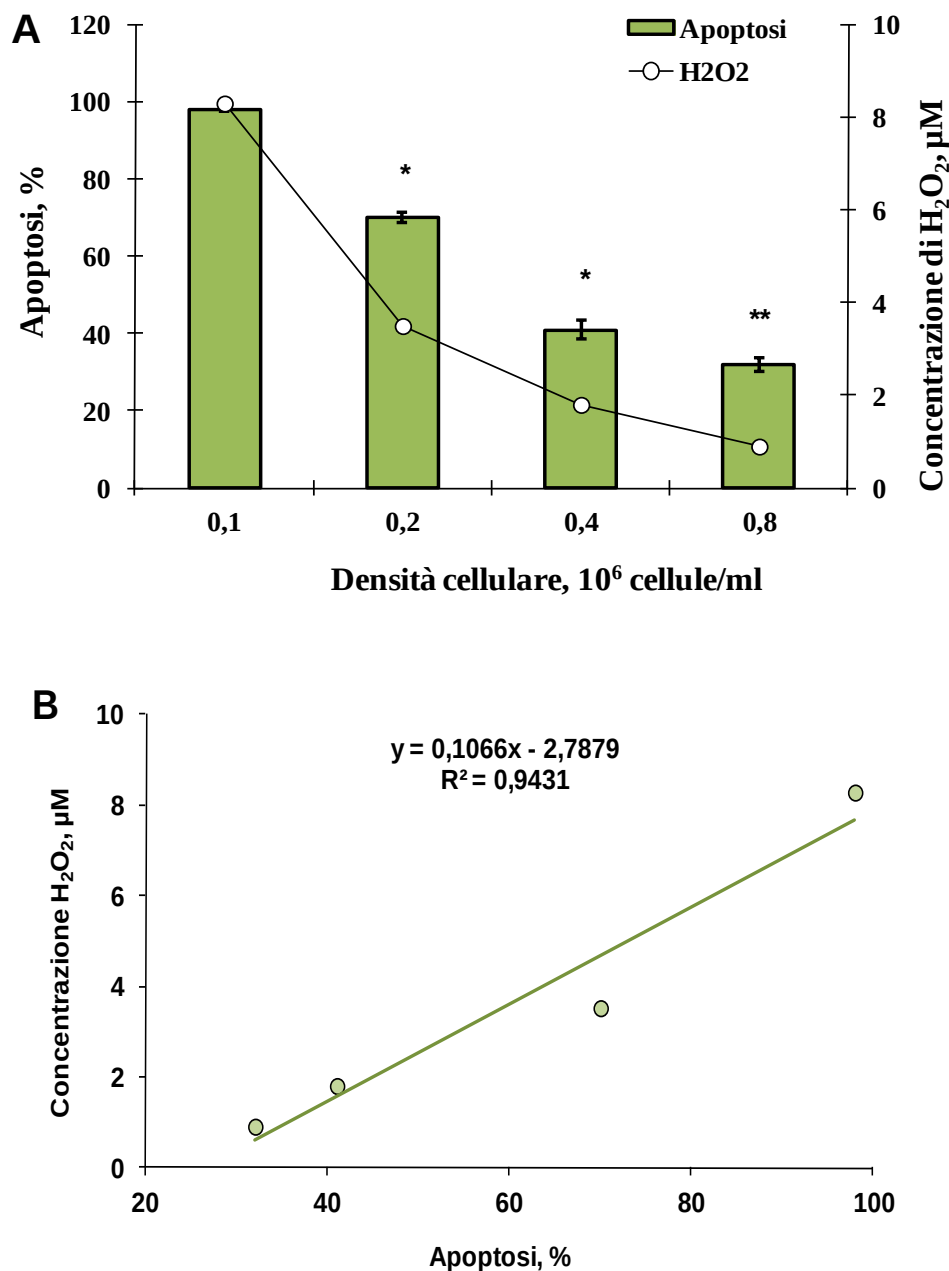


Fig.21 Effetto della densità cellulare sull'apoptosi indotta dal 3,4-DHPEA e sulla produzione di H_2O_2 . (A) Le cellule HL60 seminate a diverse densità ($0,1 \times 10^6$ - $0,8 \times 10^6$ /mL), sono state esposte al 3,4-DHPEA ($100 \mu M$) in terreno RPMI completo per 24h e la percentuale di cellule apoptotiche è stata valutata dal microscopio a fluorescenza; la concentrazione di H_2O_2 nel terreno è stato determinato con il metodo dell'ossidazione degli ioni ferrosi e dello xilenolo orange. I dati rappresentano la media $\pm$ SD di tre esperimenti differenti *** $p < 0.001$. (B) Correlazione tra la concentrazione di H_2O_2 accumulata nel terreno di coltura e la percentuale di apoptosi. I dati rappresentano la media $\pm$ SD di 3 esperimenti indipendenti.

Per approfondire ulteriormente il risultato ottenuto in precedenza e cioè che le cellule erano in grado di eliminare efficacemente il H_2O_2 dal terreno di coltura, questo composto è stato aggiunto alla dose di 50 μM a sospensioni cellulari aventi una diversa densità ed a tempi successivi è stata valutata la dose rimanente. Come atteso, il H_2O_2 veniva rimosso attivamente dal terreno (Fig. 20B) con una cinetica di eliminazione altamente dipendente dalla densità cellulare; a 0.1×10^6 cellule/mL la vita media dell' H_2O_2 era di circa di 15 min e questo valore è stato ridotto a circa 3 min, quando la densità cellulare è stata aumentata a 0.8×10^6 cellule/mL.

Se l'accumulo di H_2O_2 nel terreno di coltura è l'evento primario responsabile dell'induzione dell'apoptosi, ci si aspetterebbe che l'effetto pro-apoptotico indotto dal 3,4-DHPEA sia correlato al diverso numero di cellule piastrato. Per testare questa ipotesi, sono state seminate differenti sospensioni cellulari aventi una diversa densità le quali sono state poi trattate con il 3,4-DHPEA (100 μM) per 24h. Al termine dell'incubazione è stata dosata sia la concentrazione di H_2O_2 accumulata nel terreno di coltura che l'apoptosi delle cellule HL60. I risultati hanno indicato chiaramente che esiste una relazione inversamente proporzionale tra la percentuale di cellule apoptotiche e il numero di cellule seminate (Fig. 21A). Al contrario, la percentuale di cellule apoptotiche e la concentrazione di H_2O_2 nel terreno di coltura sono direttamente e significativamente correlate (Fig. 21B). Infine è stato investigato se, anche l'effetto anti-proliferativo indotto dal 3,4-DHPEA, era mediato dal rilascio di H_2O_2 anche in linee cellulari provenienti da tumori solidi, quali quello della mammella (MDA e MCF-7), della prostata (LNCap e PC3) e del colon (SW480 e HCT116). Le cellule sono state seminate in una piastra da 96 pozzetti (5000/pozzetto) ed incubate per 24h a 37°C. Dopodiché il terreno è stato sostituito con terreno fresco contenente il 3,4-DHPEA e la CAT, quindi la proliferazione è stata valutata dopo 72h con il saggio dell'MTT. Anche in queste cellule il 3,4-DHPEA ha indotto un evidente effetto anti-proliferativo dose-dipendente mentre l'aggiunta della CAT ha drasticamente prevenuto questo effetto (Fig. 22). Poiché le linee cellulari hanno mostrato risposte diverse al trattamento con 3,4-DHPEA, si è deciso di misurare l'accumulo di H_2O_2 nel terreno dopo un incubazione di 24h con 3,4-DHPEA (100 μM). I risultati sono mostrati in Tabella 5 in cui è riportata la $IC_{50\%}$ (concentrazione del 3,4-DHPEA in grado di causare il 50% di inibizione della crescita

rispetto al controllo dopo 72 h di trattamento). I valori di $IC_{50\%}$ sono negativamente correlati alla concentrazione di H_2O_2 ottenuta in presenza dei differenti tipi cellulari. Questi risultati suggeriscono che la sensibilità delle differenti linee cellulari all'effetto anti-proliferativo del 3,4-DHPEA è inversamente correlato alla loro abilità di rimozione dell' H_2O_2 dal terreno di coltura. In conclusione si può quindi affermare che l'accumulo di H_2O_2 influenza l'effetto anti-proliferativo del 3,4-DHPEA indipendentemente dall'organo da cui derivano le linee cellulari tumorali.

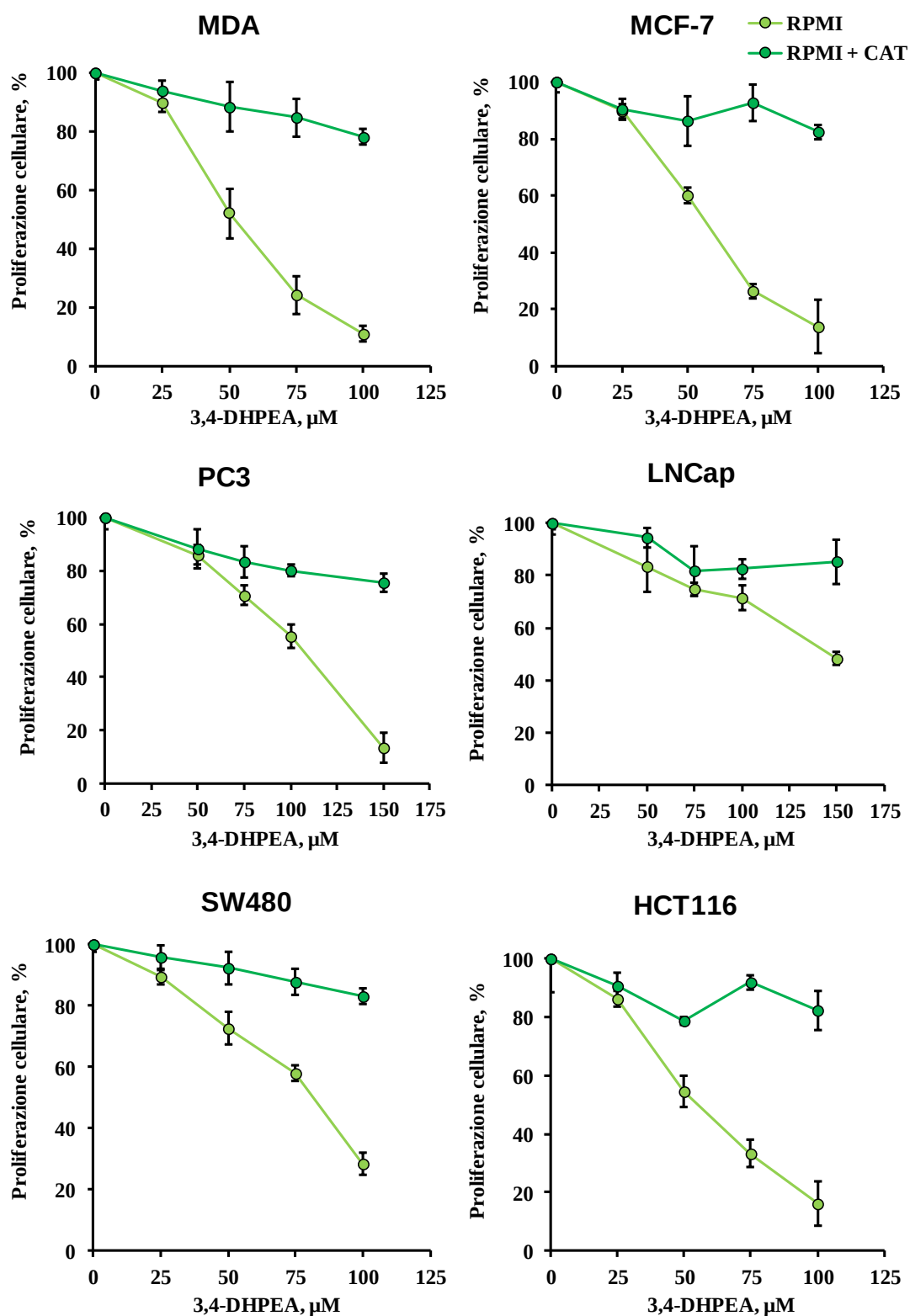


Fig.22 Effetti dose-dipendenti del 3,4-DHPEA sulla proliferazione delle differenti linee cellulari. Le cellule sono state incubate per 72h con concentrazioni crescenti di 3,4-DHPEA in presenza o in assenza della Catalasi (CAT) ed il numero di cellule è stato determinato con la tecnica di esclusione al trypan blu. I dati sono la media $\pm$ SD di 5 esperimenti.

Tab.7 Valori di IC 50% (72h di trattamento) e concentrazione di H₂O₂ accumulata nel terreno dopo trattamento delle differenti linee cellulari con 3,4-DHPEA (100 µM) per 24h.

LINEE CELLULARI	IC 50% (µM)	H ₂ O ₂ (µM)
MDA	52+/-4 ^d	23,8 +/-2,8 ^a
HCT116	55 +/- 7 ^d	23,3 +/- 5 ^a
MCF-7	58 +/- 8 ^d	15,7 +/- 3,7 ^{b,c}
SW480	82 +/- 10 ^c	21,5 +/- 2,7 ^{a,b}
PC3	103 +/- 7 ^b	12 +/- 2,9 ^c
LNCap	146 +/- 12 ^a	8,8 +/- 3,4 ^c

I valori sono le medie ± SD di 5 esperimenti. Le medie senza una lettera in comune differiscono in modo statisticamente significativo secondo il test di Tukey, $P < 0.05$.

Infine si è studiato se composti strutturalmente simili al 3,4-DHPEA, il tirosolo (p-HPEA) e l'acido caffeico (CA) (Fig. 23A), erano capaci di generare il H₂O₂ e di indurre l'apoptosi nelle cellule HL60. Come si può osservare nella Fig. 23B, né il p-HPEA né CA erano in grado di causare un significativo aumento della percentuale delle cellule apoptotiche (Fig. 23B) e della concentrazione di H₂O₂ nel terreno di coltura (Fig. 23C). Questi risultati suggeriscono che il gruppo orto-ossidrile dell'anello fenolico presente nella struttura molecolare del 3,4-DHPEA è fondamentale (infatti il p-HPEA non ha effetto), ma non sufficiente (infatti l'acido caffeico non ha effetto) per provocare gli effetti sopra riportati. In questo secondo caso si può infatti concludere che la parte etanolica del 3,4-DHPEA potrebbe anche essa essere importante per la generazione di H₂O₂ e per l'induzione di apoptosi.

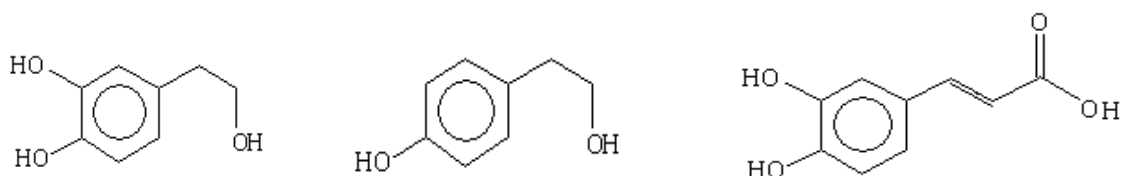
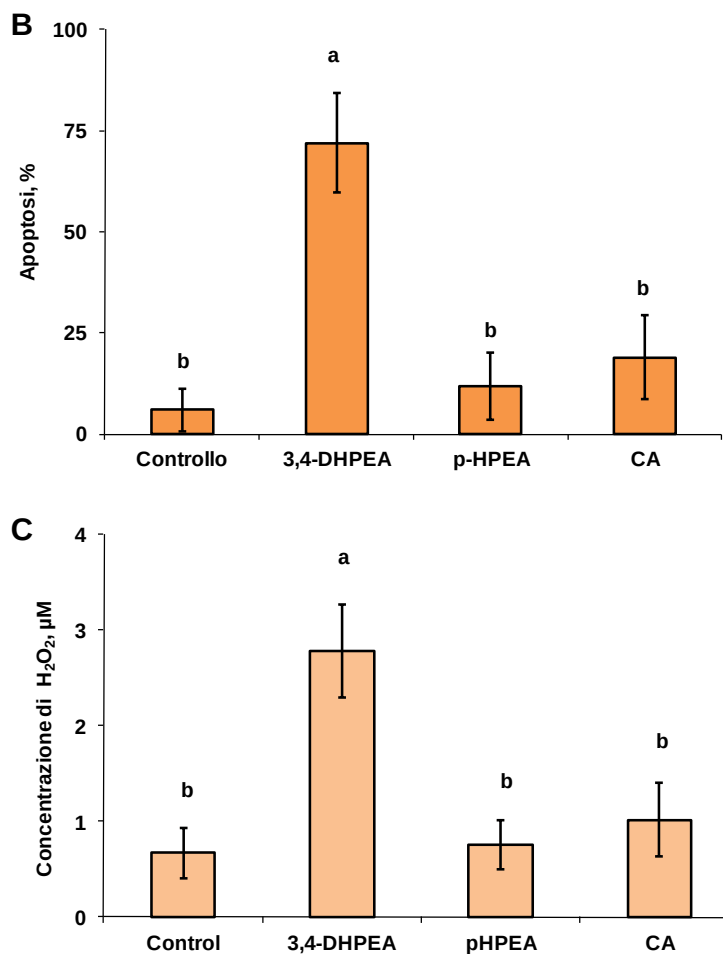
A**IDROSSITIROSULO,
3,4-DHPEA****TIROSOLO,
p-HPEA****ACIDO CAFFEICO,
(CA)**

Fig.23 Effetto di differenti composti, strutturalmente simili al 3,4-DHPEA, sull'apoptosi nelle HL60 e sull'accumulo di H₂O₂ nel terreno di coltura. Formule di struttura dei composti analizzati (A). Le HL60 (0,2X10⁶/mL) sono state trattate con 100µM di fenoli in terreno RPMI per 24h. Dopo l'incubazione la percentuale di cellule apoptotiche è stata valutata con il microscopio a fluorescenza (B), e la concentrazione di H₂O₂ nel terreno di coltura è stato determinata con il metodo dell'ossidazione degli ioni ferrosi e dello xilenolo orange (C). I dati rappresentano la media ± SD di tre esperimenti indipendenti. Le barre con una lettera differente differiscono in maniera significativa secondo il test di, Tukey, P<0.05.

7.2.4 INIBIZIONE DEL CICLO CELLULARE DA PARTE DEL 3,4-DHPEA: INIBIZIONE DELLA FOSFORILAZIONE DI Rb

Dato che il 3,4-DHPEA è in grado di influenzare profondamente la proliferazione cellulare e l'apoptosi in tutti i tipi di cellule analizzate, si è ipotizzato anche un suo possibile coinvolgimento nella regolazione del ciclo cellulare. Questo processo è regolato da una sequenziale attivazione ed inattivazione di proteine chinasi ciclina-dipendenti (CDKs), che controllano passaggi specifici della progressione del ciclo cellulare, come la transizione G₁/S e G₂/M. L'attività dei CDKs è regolata da diverse famiglie di proteine chiamate "CDK inhibitors" (CKDi), che legano ed inattivano i complessi ciclina-CDK.

In un precedente studio, è stato dimostrato che il 3,4-DHPEA è in grado di indurre una riduzione dell'espressione del complesso CDK6 [165], e un incremento dei CKDi (p21WAF1/Cip1 e p27Kip). Tali effetti possono risultare nella inibizione della fosforilazione di proteine necessarie per la progressione del ciclo cellulare [2,22]. Un ruolo centrale nella progressione del ciclo cellulare appartiene alle così dette "pocket proteins" o proteine del Retinoblastoma (Rb), importanti molecole responsabili del controllo del passaggio della cellula dalla fase G₁ alla fase S. La fosforilazione di Rb per mezzo dei complessi ciclina-CDK provoca il rilascio del fattore di trascrizione E2F, che può attivare geni i cui prodotti sono importanti per la cellula per entrare nella fase S [166].

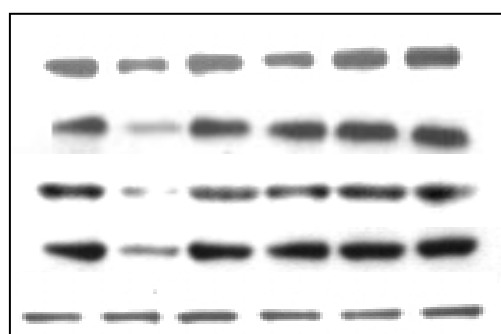
Nella parte finale di questo studio si è quindi studiato se il 3,4-DHPEA era in grado di modificare lo stato di fosforilazione della proteina Rb.

I risultati di questa sperimentazione hanno dimostrato che il trattamento con 3,4-DHPEA provocava un debole effetto inibitorio sull'espressione di Rb mentre si è evidenziata una chiara riduzione nello stato di fosforilazione di Rb in diversi siti quali quello della Serina 780, Ser 807/811 e Ser 795 (Fig.24 A-B).

Per avere la conferma che anche questo effetto era mediato da un accumulo di H₂O₂ nel terreno di coltura, il trattamento delle cellule è stato fatto in presenza sia di NAC che di CAT. Analogamente a quanto visto per la proliferazione e l'apoptosi, l'inclusione dei due composti ha inibito completamente l'effetto esercitato dal 3,4-DHPEA sulla fosforilazione di Rb.

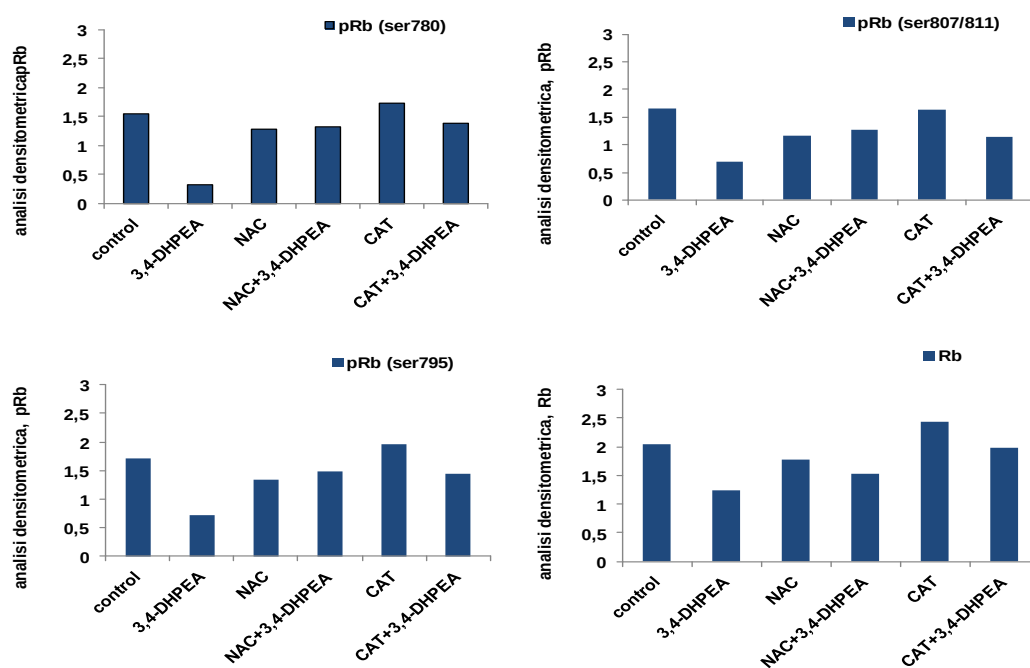
Si può quindi concludere che il 3,4-DHPEA è in grado di ridurre la fosforilazione di Rb e di alterare la progressione del ciclo cellulare delle HL60 attraverso il rilascio di H₂O₂ nel terreno di coltura (Fig.24).

DPE						
100μM	-	+	-	+	-	+
NAC						
10mM	-	-	+	+	-	-
CAT						
100U/ml	-	-	-	-	+	+



Rb totale
Rb fosforilata in Ser 795
Ser 807-811
Ser 780
β-Actina

Fig.24 (A) Effetto del 3,4-DHPEA (100μM), NAC (10mM) e CAT (100U/ml) sull'espressione della proteina Rb delle cellule HL60 dopo 24h di esposizione e analizzato tramite la metodica del Western blotting. La figura mostra i risultati di 1 esperimento, che è rappresentativo di 3 che hanno dato risultati simili. (B) Analisi densitometrica di Rb e pRb relativa alla Figura 24A.



8. DISCUSSIONE

8.1 VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI SULLA INIZIAZIONE TUMORALE DEGLI EPOSSIDI DEI COV E DEI COMPOSTI FENOLICI

In questo studio si è dimostrato che i fenoli, quando usati come composti purificati o presenti in estratti grezzi costituiti da una miscela complessa di composti derivati sia dall'olio di oliva che dalle acque di vegetazione, sono in grado di prevenire il danno al DNA. Questi effetti anti-genotossici sono stati ottenuti a concentrazioni di fenoli (1–10 $\mu\text{mol/L}$) che potrebbero essere raggiunte facilmente nei tessuti, con un consumo ordinario di 50 g/die di olio d'oliva. Infatti, dati di letteratura hanno chiaramente indicato che i fenoli sono efficacemente assorbiti nell'uomo [167]. Un recente studio di intervento ha dimostrato che il consumo di 40 mL di olio d'oliva contenente una considerevole quantità di fenoli (366 mg/kg) ha provocato un incremento della concentrazione plasmatica di 3,4-DHPEA e p-HPEA a valori superiori a 10 $\mu\text{mol/L}$ nelle prime 4h dopo l'ingestione [167].

I risultati ottenuti in questo lavoro di dottorato, sono in parziale accordo con altri lavori presenti in letteratura che hanno dimostrato un effetto protettivo del 3,4-DHPEA alla concentrazione di 10 $\mu\text{mol/L}$ nelle cellule tumorali della prostata umana [168]. Anche i risultati ottenuti mediante il sistema ex-vivo in cui i ROS sono prodotti dai monociti attivati con la PMA, supportano l'ipotesi che i composti fenolici potrebbero prevenire efficacemente il danno ossidativo al DNA alle basse concentrazioni [169]. Questo modello simula più strettamente lo stress ossidativo “in vivo”, perché il trattamento con la PMA attiva enzimi quali la NADPH ossidasi e l'NO sintasi. Nel primo caso l'enzima è in grado di catalizzare il trasferimento di un elettrone all'ossigeno con la formazione di ione superossido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) mentre nel secondo caso si ha la formazione di NO dall'arginina. Questi composti altamente reattivi potrebbero essere i precursori di un ampio spettro di specie reattive dell'ossigeno in grado di indurre un danno al DNA dei linfociti [169]. E' importante enfatizzare che nel sistema PMA-monociti attivati, il p-HPEA era più efficace del 3,4-DHPEA nella prevenzione del danno al DNA. Questi risultati sono inaspettati, poiché gli orto-

difenoli come il 3,4-DHPEA, sono scavenger di radicali più potenti ed antiossidanti più efficaci, del semplice fenolo, come il p-HPEA [170].

Comunque le specie reattive prodotte dai monociti attivati sono differenti e più complesse rispetto alla semplice H_2O_2 . Ad esempio alcuni studi hanno mostrato una potente attività di scavenger del 3,4-DHPEA verso le specie reattive dell'ossigeno, quali l'anione superossido [171], mentre altri autori hanno dimostrato una forte attività antiossidante nei confronti del H_2O_2 ma non dell'anione superossido [172].

Perciò, non è da escludere un reale effetto inibitorio del p-HPEA sull'attività enzimatica della NADPH ossidasi dei monociti, con una conseguente riduzione della produzione di anione superossido, mentre il 3,4-DHPEA potrebbe non influenzare questo enzima [173].

Per quanto riguarda i composti secoiridoidi, anch'essi sono stati testati alla dose di 10 $\mu\text{mol/L}$ per valutare l'abilità preventiva nei riguardi del danno al DNA. Ad esempio la forma dialdeidica dell'acido elenolico legato all'idrossitirosolo (3,4-DHPEA-EDA), ha dimostrato una attività protettiva simile a quella del 3,4-DHPEA. Gli altri composti purificati, quali l'isomero dell'oleuropeina aglicone (3,4-DHPEA-EA), l'oleuropeina, il tirosolo, (p-HPEA), la forma dialdeidica dell'acido elenolico legato al tirosolo (p-HPEA-EDA), l'acido caffeico (CA) ed il verbascoside hanno sempre protetto le cellule nei confronti del danno al DNA indotto dall' H_2O_2 , ma con una efficienza minore (Tab. 2).

È stato suggerito da alcuni Autori che, tra questi composti, solo quelli che hanno una struttura catecolica, caratterizzata da un anello aromatico a cui sono legati due gruppi idrossilici, siano importanti ai fini della salute umana. La presenza dell'anello catecolico conferisce infatti ai polifenoli una potente attività antiossidante in quanto questo gruppo è capace di stabilizzare la struttura dei radicali liberi attraverso la formazione di legami a idrogeno intramolecolari [89]. Sembra inoltre che i composti dotati di maggiore attività antiossidante siano quelli in cui i due gruppi idrossilici si trovano in posizione orto, piuttosto che in posizione meta o para.

In una seconda fase dello studio è stato valutato il danno al DNA provocato da alcuni metaboliti dei COV, responsabili della loro mutagenicità, genotossicità, e cancerogenesi. Tutti gli epossidi considerati hanno provocato un danno al DNA quando testati "in vitro" sia nei PBMC che nelle cellule HL60. Questo dato è di

particolare interesse in quanto gli epossidi, essendo composti particolarmente reattivi con molecole nucleofile agiscono come agenti alchilanti causando essenzialmente la formazioni di addotti al DNA [174,175] i quali non sono direttamente rilevabili con il comet assay. Comunque, gli addotti al DNA possono innescare meccanismi di riparo tramite glicosilasi ed endonucleasi producendo siti apurinici/apirimidinici nel primo e/o rotture ai filamenti del DNA nel secondo caso. Entrambe queste alterazioni al materiale genetico sono sensibilmente rilevate dal comet assay [176,177]. Questi dati suggeriscono che la formazione di addotti al DNA è seguita da un più grave danno al DNA. Tuttavia si potrebbe ipotizzare un altro meccanismo di genotossicità, quale la generazione di specie reattive dell'ossigeno. Questa ipotesi è supportata dalla osservazione che SO è in grado di produrre l'ossidazione del DNA come dimostrato dall'aumento dei livelli di 8-idrossi-2(')-deossiguanosina (8-OHdG) in cellule neuronali SK-N-MC [178]. Inoltre, è stato anche dimostrato che il DEB induce l'apoptosi in linfoblasti TK6 di ratto attraverso la produzione dei ROS [179].

Sulla base dei risultati ottenuti dagli studi dose-risposta che hanno permesso di valutare il potenziale di genotossicità dei singoli composti, è stato possibile creare una scala di effetto che è in parziale accordo con la classificazione stabilita dallo IARC, sulle sostanze cancerogene. Dai risultati è emerso che SO, EB e DEB sono i composti più attivi ed una contemporanea esposizione a questi agenti, che potrebbe avvenire nei posti di lavoro come ad esempio nelle industrie di materie plastiche, potrebbe essere di particolare importanza per la salute umana. Comunque, si dovrebbe tener presente che il contributo all'incidenza di leucemia ed ad altri tipi di cancro in lavoratori esposti agli epossidi dei COV, non è abbastanza chiaro dato che questi individui sono esposti allo stesso tempo anche ad altri inquinanti ambientali, che possono essere considerati fattori confondenti [180,181]. Il forte potenziale genotossico dello SO riportato in questo studio è in accordo con precedenti risultati che hanno messo in evidenza l'effetto del danno al DNA esercitato da questo composto dopo brevi periodi di esposizione (0.5–2 h) [182]. Inoltre questi risultati sono in accordo con quelli ottenuti da Cemeli et al. [113] secondo cui lo SO era più genotossico degli altri epossidi ed in particolare degli epossidi dell'1,3-butadiene, EB e DEB. Tuttavia, l'inclusione dello SO nel gruppo 2A della classificazione dei cancerogeni effettuata dallo IARC, potrebbe essere dovuta a delle scarse evidenze epidemiologiche disponibili, piuttosto che alla sua dimostrata genotossicità nei

sistemi “in vitro” e nei modelli animali. Il forte effetto genotossico indotto dallo SO riportato in questo studio, sia nei linfociti che nelle cellule HL60, potrebbe indurre i ricercatori ad effettuare studi epidemiologici più approfonditi e con il fine di dimostrare la cancerogenicità dello SO come recentemente suggerito da Ward e coll. [182]. L’inclusione di FCS nel terreno di coltura durante il trattamento con gli epossidi permette di prolungare l’esposizione fino a 24h. In queste condizioni si è verificato un significativo e generale aumento del danno al DNA in seguito al trattamento con i differenti composti che è risultato più evidente nei PBMC rispetto alle HL60. In particolare, PO e BO non hanno manifestato alcun effetto genotossico dopo 2h, mentre hanno dati risultati positivi dopo 24h di trattamento. Questi dati indicano inoltre che dopo un lungo periodo di incubazione, i sistemi di riparo del DNA, sia nelle cellule non proliferanti (PBMC) che proliferanti (HL60), non sono abbastanza efficienti e quindi non sono in grado riparare completamente il danno al DNA causato dagli epossidi.

Gli altri composti testati in questo lavoro hanno mostrato un potenziale genotossico correlato alla loro differente reattività, confermando così i dati in letteratura che sono stati ottenuti misurando altri end-points di danno al DNA, quali scambio di cromatidi fratelli (SCE), aberrazioni cromosomiche (CA), e formazione di micronuclei (MN). Ad esempio l’effetto genotossico di PO è evidente solo alle concentrazioni più alte e dopo un prolungato tempo di incubazione, in accordo con gli altri dati presenti in letteratura in cui è stato dimostrato che questo composto è in grado di provocare rotture al DNA a singolo filamento in differenti sistemi cellulari, di formare addotti sia al DNA che all’emoglobina e di provocare lo scambio di cromatidi fratelli nei PBMC isolati da soggetti esposti [183].

E’ da notare comunque che per questo ultimo composto sono state riportate evidenze sul suo potenziale cancerogeno nei confronti del tumore alle ghiandole mammarie in animali da esperimento suggerendo l’opportunità di effettuare ulteriori studi nelle donne esposte sul posto di lavoro [183]. Anche l’effetto genotossico riscontrato per BO, che è risultato essere il composto meno attivo, sembra essere in accordo con i dati presenti in letteratura. Infine, sebbene IO ed EB abbiano una buona parte della loro struttura chimica simile, il basso potenziale genotossico di IO potrebbe essere direttamente correlato alla presenza del gruppo metile al carbonio 2 che potrebbe

ridurre le proprietà alchilanti di IO sia a causa di una più bassa tendenza a formare carbocationi, sia per la presenza di un ingombro sterico.

In conclusione, tramite l'uso della stessa tecnica (comet assay), è possibile comparare la genotossicità dei differenti epossidi dei COV in modo da ottenere ulteriori informazioni circa il rischio per la salute della popolazione esposta.

Dato che i risultati ottenuti hanno dimostrato il coinvolgimento dei ROS nel meccanismo di genotossicità provocato dagli epossidi, si è ipotizzato che oltre alla capacità, ormai nota da tempo, di indurre la formazione di addotti al DNA e/o all'emoglobina [184,185], un altro meccanismo potrebbe essere quello di causare uno stress ossidativo alla cellula [186-189]. A questo proposito è stata utilizzata la NAC, per le sue note capacità antiossidanti e l'enzima catalasi, in grado di provocare una efficiente riduzione del danno al DNA nei PBMC umani. Infatti, l'abilità della NAC di fungere come potente scavenger di radicali è una caratteristica correlata alle proprietà intrinseche della molecola, mentre l'inibizione della genotossicità potrebbe essere una conseguenza dell'induzione di meccanismi intracellulari, quali la modulazione dell'espressione di alcuni geni coinvolti nei processi ossidativi [190].

Infatti, dato che la NAC nella sospensione cellulare a tempi brevi (2h) non provoca alcun effetto protettivo, si può supporre che la riduzione del danno al DNA dopo 24h di trattamento con la NAC, possa essere dovuto all'induzione di meccanismi intracellulari che necessitano di un tempo maggiore per poter essere attivi. La presenza della CAT invece riduce il danno genotossico al DNA delle cellule già dopo 2h d'incubazione a dimostrazione del coinvolgimento dell'H₂O₂ che potrebbe accumularsi nello spazio extracellulare. L'effetto protettivo esercitato invece da OO-PE, è ben evidente in seguito al trattamento con SO, EB e DEB sia dopo 2h che 24h d'incubazione, anche se la maggior protezione da parte dell'estratto dell'olio è stata ottenuta a tempi brevi. Alla luce di questi risultati quindi, WW-PE è stato testato al solo tempo di 2h, poiché è la condizione in cui si è ottenuto il maggior effetto protettivo.

La protezione esercitata dai composti fenolici contenuti nell'estratto derivato dalle WW-PE riveste un particolare interesse, in quanto da un prodotto di scarto quali le acque di risulta della lavorazione delle olive, è possibile ottenere un duplice vantaggio. Il primo è la riduzione del carico inquinante riversato nell'ambiente,

mentre il secondo è il recupero di sostanze biologicamente attive e a basso costo, che possono essere utilizzate come “nutraceutici”.

Poichè in letteratura non ci sono studi fino ad oggi, circa la protezione dei polifenoli verso il danno genotossico indotto dagli epossidi dei COV, molti e più approfonditi studi dovrebbero essere condotti per ottenere ulteriori informazioni su questo argomento. Tali studi sono di grande importanza visto che la prevenzione del danno al DNA nei linfociti può essere considerato un fenomeno predittivo di un minor rischio di contrarre una neoplasia.

8.2 VALUTAZIONE DELL'EFFETTO ANTI-PROMOZIONE/PROGRESSIONE TUMORALE DELL'IDROSSITIROSOLO

In questo studio è stato esaustivamente dimostrato, per la prima volta, che gli effetti indotti dal 3,4-DHPEA ad alte dosi in linee cellulari tumorali, erano dovuti ad uno stress ossidativo mediato principalmente dall'abilità del 3,4-DHPEA di generare H₂O₂ extracellulare nel terreno di coltura. Queste conclusioni sono supportate dalle seguenti evidenze: (i) l'attività anti-proliferativa e pro-apoptotica del 3,4-DHPEA era efficientemente inibita da noti antiossidanti come la NAC, l'ascorbato e l' α -tocoferolo; (ii) la detossificazione extracellulare di H₂O₂ da parte della CAT ha ridotto l'effetto pro-apoptotico del 3,4-DHPEA; (iii) una più efficace rimozione di H₂O₂ ottenuta aumentando la densità cellulare durante l'esposizione al 3,4-DHPEA ha causato una riduzione della concentrazione di H₂O₂ accumulata nel terreno di coltura e di conseguenza una minor percentuale di cellule apoptotiche; (iv) molecole strutturalmente simili al 3,4-DHPEA (p-HPEA e CA), non sono state in grado né di generare alti livelli di H₂O₂ né di indurre apoptosi nelle cellule HL60. L'attività pro-ossidante del 3,4-DHPEA non è il primo esempio di composti che pur avendo un elevato potere antiossidante, in determinate condizioni sperimentali si comportano come pro-ossidanti. Infatti, precedenti pubblicazioni hanno dimostrato che altri composti fenolici derivati da piante possono indurre uno stress ossidativo [191,192]. In particolare, un'attività pro-ossidante correlata con la tossicità nelle HL60 è stata

dimostrata per i flavonoidi, l'acido gallico, l'acido caffeico e loro derivati [193]. Recentemente anche per quanto riguarda il resveratrolo, un polifenolo presente nel vino rosso, è stato dimostrato che esso è in grado di esercitare effetti pro-ossidanti inducendo sia la senescenza nelle cellule tumorali di colon HCT-116WT [194] che il danno al DNA nei linfociti umani [195]. Comunque, nei casi sopra riportati non è stato dimostrato il rilascio di H_2O_2 extracellulare, mentre l'effetto pro-ossidante mediato da un incremento della concentrazione di H_2O_2 nel terreno è stato dimostrato per uno dei polifenoli del tè, l'(-)-epigallocatechina-3-gallate (EGCG) [196-198]. Per spiegare questa attività pro-ossidante dei fenoli derivati da alimenti di origine naturale si può supporre un possibile meccanismo che coinvolga sia l'anione superossido O_2^- che i metalli di transizione [192]. In questo sistema l'ossidazione iniziale della parte catecolica dovuta al Cu(II) o Fe(II) genera semichinoni che possono reagire con O_2 e formare O_2^- dalla cui disproporzione si può formare H_2O_2 [192]. Sebbene nel presente studio il meccanismo di produzione di H_2O_2 mediato dal 3,4-DHPEA non è stato ancora investigato in dettaglio, possiamo concludere che nelle nostre condizioni sperimentali la sola parte catecolica non è sufficiente a svolgere questo effetto, dato che il tirosolo e l'acido caffeico non hanno provocato alcun effetto.

Inoltre i risultati con la fenantrolina (PNT), un composto chelante del Fe(II), suggeriscono che il Fe(II) non è coinvolto nell'abilità del 3,4-DHPEA di rilasciare H_2O_2 nel terreno di coltura. Oltre al meccanismo pro-apoptotico del 3,4-DHPEA è stato anche dimostrato che l'accumulo di H_2O_2 influenzi l'effetto anti-proliferativo del 3,4-DHPEA in altre linee cellulari indipendentemente dal loro organo di origine, quale mammella, prostata e colon. Quindi, quando le cellule sono esposte a condizioni che supportano l'accumulo di H_2O_2 quali RPMI completo, il 3,4-DHPEA effettivamente sopprime la crescita cellulare mentre l'addizione di CAT previene questo effetto. Inoltre, la quantità di H_2O_2 accumulata nel terreno di coltura in presenza delle differenti cellule tumorali era direttamente correlata all'attività antiproliferativa del 3,4-DHPEA suggerendo che la diversa sensibilità delle cellule all'effetto chemiopreventivo del 3,4-DHPEA, potrebbe essere correlato alla loro capacità di rimuovere l' H_2O_2 dal terreno di coltura. La produzione di H_2O_2 potrebbe anche essere alla base di altri effetti esercitati dal 3,4-DHPEA sull'espressione di differenti geni e sullo stato di fosforilazione delle proteine coinvolte in alcune vie di

trasduzione del segnale. Infatti il 3,4-DHPEA è in grado di ridurre la fosforilazione della proteina Rb, a livello di alcuni residui di Serina e questo fenomeno potrebbe rappresentare un possibile meccanismo attraverso il quale il 3,4-DHPEA induca l'arresto del ciclo delle cellule tumorali. Anche altri studi condotti sulla inibizione del ciclo cellulare in altri tipi cellulari tumorali, quali le MCF10A (linea tumorale derivata dalla mammella) e le NBT-II (linea cellulare derivata dal tumore alla vescica), in seguito al trattamento con l'EGCG, hanno dimostrato che questo composto è in grado di inibire la fosforilazione della proteina Rb, causando l'arresto del ciclo cellulare nella fase G1 [199].

In conclusione, i risultati del presente studio potrebbero essere interessanti per progettare studi "in vivo", prima nella sperimentazione animale e successivamente nell'uomo, con lo scopo di dimostrare l'abilità dei fenoli dell'olio di oliva di prevenire le diverse fasi del processo di cancerogenesi indotta da inquinanti ambientali. Tale aspetto infatti, può avere importanti implicazioni nell'evitare o ridurre i danni legati ad esposizioni pregresse ad inquinanti presenti nei diversi comparti ambientali.

9. CONCLUSIONI

Al termine di una ricerca triennale volta allo studio sia degli effetti genotossici di importanti inquinanti atmosferici che degli effetti chemiopreventivi di composti fenolici derivati sia dall'olio extravergine di oliva che dalle acque di vegetazione, i risultati ottenuti possono essere riassunti come segue:

1. E' stato possibile costruire una scala di genotossicità dei diversi epossidi derivati da alcuni COV (alcheni) nella quale il composto più genotossico è risultato lo SO seguito dagli altri nel seguente ordine EB>DEB>IO>PO>BO.
2. E' stata messa in evidenza la capacità dei composti fenolici di prevenire il danno al DNA indotto sia dal perossido di idrogeno che da alcuni epossidi sopra menzionati (SO, EB e DEB). È interessante sottolineare che le dosi di fenoli necessarie per avere un effetto preventivo significativo sono risultate molto basse (pari e inferiori a 1 µg/ml e/o µM) e probabilmente raggiungibili "in vivo" in soggetti che seguono una dieta mediterranea ricca di olio d'oliva.
3. Si è dimostrato che una parte del danno al DNA indotto dagli epossidi è mediato dallo stress ossidativo. Tale dato può spiegare l'effetto preventivo nei confronti del danno al DNA esercitato dai fenoli, che sono ampiamente riconosciuti da una vasta letteratura quali potenti anti-ossidanti.
4. Tra i polifenoli dell'olio d'oliva quello maggiormente studiato è stato l'idrossitirosolo (3,4-DHPEA) il quale ha mostrato un effetto chemio preventivo sia nei confronti dell'iniziazione tumorale, attraverso l'inibizione del danno al DNA in un intervallo di concentrazione compreso tra 1-10µM, sia nei confronti della promozione tumorale attraverso l'inibizione della proliferazione e l'induzione dell'apoptosi in cellule tumorali. Questo secondo effetto è risultato evidente solo a concentrazioni comprese tra 50 e 100 µM ed

è mediato da un effetto pro-ossidante espletato attraverso la produzione di perossido di idrogeno nel terreno di coltura delle cellule.

5. Infine, è stato dimostrato che un possibile meccanismo attraverso il quale il 3,4-DHPEA esercita l'effetto anti-proliferativo e altera la progressione del ciclo cellulare, inibendo il passaggio delle cellule dalla fase G1 alla fase S, consiste nella inibizione della fosforilazione di Rb a livello di alcuni residui di Serina. Tale effetto può essere la conseguenza di una "over-espressione" degli inibitori delle chinasi ciclina dipendenti come p21 e p27 da parte del 3.4-DHPEA.

In definitiva, i polifenoli dell'olio di oliva svolgono un importante effetto chemiopreventivo, interferendo con il processo di cancerogenesi sia nella fase di iniziazione che nella fase di promozione/progressione tumorale. In particolare, va sottolineata la capacità di questi importanti componenti minori dell'olio di oliva, principale alimento che distingue la dieta mediterranea dalle altre abitudini alimentari, di contrastare efficacemente le proprietà genotossiche e cancerogene dei composti organici volatili (COV), inquinanti ubiquitari sempre presenti nelle atmosfere sia outdoor che indoor e non solo nelle atmosfere inquinate urbane.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Arts I.C., Jacobs D.R., Jr. Harnack L.J., Gross M., Folsom A.R. “*Dietary catechins in relation to coronary heart disease death among postmenopausal women*”. Epidemiology 2001, 12: pp668-675.
- [2] Tzonou A, Signorello LB, Laggiou P, Wu J, Trichopoulos D, Trichopoulou A. “*Diet and cancer of the prostate: a case-control study in Greece*.” Int J Cancer. 1999;80:704–8.
- [3] Garcia-Segovia P, Sanchez-Villegas A, Doreste J, Santana F, Serra-Majem L. “*Olive oil consumption and risk of breast cancer in the Canary Islands: a population-based case-control study*.” Public Health Nutr. 2006;9:163–7.
- [4] Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C, Jimenez L, “*Dietary polyphenols and the prevention of diseases*”. Crit Rev Food Sci Nutr; 2005;45:287-306
- [5] Simonyi A, Wang Q, Miller RL, Yusof M, Shelat PB, Sun AY, Sun GY. “*Polyphenols in cerebral ischemia: novel targets for neuroprotection*.” Mol Neurobiol; 2005;31:135-47
- [6] Martinez M.E. “*Primary prevention of colonrectal cancer: lifestyle, nutrition, excercise. Recent results*”. Cancer Res. 2005, 166: pp177-211.
- [7] Middleton E., Kandaswami C., Theoharides T.C. “*The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer*.” Pharmacol. Rev. 2000, 52: pp673-751.
- [8] Lasekan JB, Clayton MK, Gendron-Fitzpatrick A, Ney DM. “*Dietary olive and safflower oils in promotion of DMBA-induced mammary tumorigenesis in rats*”. Nutr. Cancer 1990; 13: 153-63.
- [9] Bartoli R, Fernández-Bañares F, Navarro E, Castellà E, Mañé J, Alvarez M, Pastor C, Cabré E, Gassull MA. “*Effect of olive oil on early and late events of colon carcinogenesis in rats: modulation of arachidonic acid metabolism and local prostaglandin E(2) synthesis*”. Gut 2000; 46: 191-99.
- [10] Visioli F, Galli C, “*The role of antioxidants in the Mediterranean diet*.” Lipids 2001;36: Suppl: S49-52
- [11] Chimi H, Cillard J, Cillard P, Rahamani M., “*Peroxyl and hydroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants*.” J. Am. Oil Chem. Soc.; 1991; 68:307-312

- [12] José Rueff, João P. Teixeira, Luís Silva Santos, Jorge Francisco Gaspar: “*Genetic effects and biotoxicity monitoring of occupational styrene exposure*”, 399 (2009) 8-23 Review Clinica Chimica Acta
- [13] S. M. Rappaport, L. L. Kupper, and Y. S. Lin : “*On the Importance of Exposure Variability to the Doses of Volatile Organic Compounds*” . Toxicological Sciences 83, 224–236 (2005).
- [14] M. E. Fracasso, D.Doria, M. Carrieri, G. B. Bartolucci, S. Quintavalle, E. De Rosa: “*DNA single- and double-strand breaks by alkaline- and immuno-comet assay in lymphocytes of workers exposed to styrene.*” Toxicology Letters 185 (2009) 9–15
- [15] Siv O.G. and J. A. Bond : “*Biomonitoring Of 1,3-Butadiene and related compounds.*” Environmental Health Perspective, 104(5)1996 Review.
- [16] B. Marczynski, M. Peel, X. Baur: “*New aspects in genotoxic risk assessment of styrene exposure: a working hypothesis Medical Hypotheses*” (2000) 54(4), 619–623
- [17] Berg, Tymoczko, Stryer . “*Biochimica*” Ed. Zanichelli 2007
- [18] Montedoro G., Servili M., Baldioli M., Selvaggini R., Miniati E., Macchioni A. “*Simple and Hydrolizable phenolic compounds in virgin olive oil*” J. Agr. Food. Chem. 1993, 41: 2228-2234.
- [19] Servili M., Baldioli M., Mariotti F., Montedoro GF., “*Phenolic composition of olive fruit and virgin olive oil: distribution in the constitutive parts of fruit and evolution during oil mechanical extraction process.*” Acta Horticulturae, 474;1999; 609-619.
- [20] Montedoro GF., “*I costituenti fenolici presenti negli oli vergini di olive. Nota 1: identificazione di alcuni acidi fenolici e il loro potere antiossidante.*” S.T.A, 3:1972;177-186.
- [21] Montedoro GF., Servili M. “*Tradizione e innovazioni tecnologiche negli oli extra vergini di oliva.*” Proceeding of the International Congress “Olive Oil Quality” Firenze (Italy) 1992, pp 97-108.
- [22] Owen R.W., Mier W., Giacosa A., Hull W. E., Spiegelhalder B., Bartsch H. “*Identification of lignans as major components in the phenolic fraction of olive oil.*” Clin. Chem., 2000, 46: pp976-988.
- [23] Franceschi S. “*Nutrients and food groups and large bowel cancer in Europe*”. Eur J Cancer Prev. 1999;8:S49–52.
- [24] Trichopoulou A, Katsouyanni K, Stuver S, Tzala L, Gnardellis C, Rimm E, Trichopoulos D. “*Consumption of olive oil and specific food groups in relation to breast cancer risk in Greece.*” J Natl Cancer Inst. 1995;87: 110–6.

- [25] Martin-Moreno JM, Willett WC, Gorgojo L, Banegas JR, Rodriguez-Artalejo F, Fernandez-Rodriguez JC, Maisonneuve P, Boyle P. "*Dietary fat, olive oil intake and breast cancer risk*". Int J Cancer. 1994;58:774–80.
- [26] La Vecchia C, Negri E, Franceschi S, Decarli A, Giacosa A, Lipworth L. "*Olive oil, other dietary fats, and the risk of breast cancer (Italy)*". Cancer Causes Control. 1995;6:545–50.
- [27] Norrish AE, Jackson RT, Sharpe SJ, Skeaff CM. "*Men who consume vegetable oils rich in monounsaturated fat: their dietary patterns and risk of prostate cancer*" (New Zealand). Cancer Causes Control. 2000;11:609–15.
- [28] Hodge AM, English DR, McCredie MR, Severi G, Boyle P, Hopper JL, Giles GG. "*Foods, nutrients and prostate cancer*". Cancer Causes Control. 2004;15:11–20.
- [29] Franceschi S, Favero A, Conti E, Talamini R, Volpe R, Negri E, Barzan L, La Vecchia C. "*Food groups, oils and butter, and cancer of the oral cavity and pharynx*." Br J Cancer. 1999;80:614–20.
- [30] Braga C, La Vecchia C, Franceschi S, Negri E, Parpinel M, Recarli A, Giacosa A, Trichopoulos D. "*Olive oil, other seasoning fats, and the risk of colorectal carcinoma*". Cancer. 1998;82:448–53.
- [31] Crosignani P, Russo A, Tagliabue G, Berrino F. "*Tobacco and diet as determinants of survival in male laryngeal cancer patients*." Int J Cancer. 1996;65:308–13.
- [32] Sieri S, Krogh V, Pala V, Muti P, Micheli A, Evangelista A, Tagliabue G, Berrino F. "*Dietary patterns and risk of breast cancer in the ORDET cohort*." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2004;13:567–72.
- [33] Palli D, Vineis P, Russo A, Berrino F, Krogh V, Masala G, Munnia A, Panico S, Taioli E, et al. "*Diet, metabolic polymorphisms and DNA adducts: the EPIC-Italy cross-sectional study*". Int J Cancer. 2000;87: 444–51.
- [34] www.agrariosereni.it/olio
- [35] Guyton A. C., Hall J. E., "*Fisiologia medica*." Ed. Edises. 2002
- [36] Mariani Costantini A., Cannella C., Tomassi G. "*Alimentazione e nutrizione umana*." Ed. Il Pensiero Scientifico 2009
- [37] www.olioesalute.it/olio
- [38] Cimato A., Baldini A., Moretti R. "*L'olio di oliva: cultivar, ambiente e tecniche agronomiche*". ARSIA, Regione Toscana, Firenze (2001).
- [39] Balice V., Carrieri C., Cera O. "*Caratteristiche analitiche delle acque di vegetazione*". Riv. Italiana- Sostanze Grasse , 1990, 67: pp9-16.
- [40] Balice V., Boari G., Cera o., Abbaticchio P. "*Indagine analitica sulle acque di vegetazione*." Nota 1 Inquinamento, 1982, 7: pp49-53

- [41] Ware G.W. "Review of environmental contamination and toxicology". Vol.163.
- [42] Arienzo M., Capasso R. "Analysis of metal cations and organic anions in olive oil mill waste waters by atomic absorption spectroscopy and ion chromatography. Detection of the metals mainly bound to the organic polymeric fraction". J.Agric. Food Chem. 2000, 48: pp1405-1410.
- [43] www.terrebrune.com/azienda/ita/olivo/05
- [44] Wang W., Heideman L., Chung C.S., Pelling J.C., Koehler K.J., Birt, D.F. "Cell-cycle arrest at G2/M and growth inhibition by apigenin in human colon carcinoma cell lines." Mol. Carcinog. 2000, 28: pp102-110.
- [45] www.olio4.com
- [46] www.frantoionline.it
- [47] www.creagri.com
- [48] Porkony J. "Natural antioxidants for food use". 1991, Science Direct
- [49] Bode A.M., Dong Z., "Molecular and cellular targets". Mol carcinog. 2006, 45,422-30
- [50] Trosko J.E., "Dietary modulation of the multistage, mechanisms of human carcinogenesis: effects of initiated stem cells and cell-cell communication." Nutr cancer 2006, 54,102-10
- [51] Vodicka P., Hemminki K. "Identification of alkylation products of styrene oxide in single- and double-stranded DNA". Carcinogenesis 1988; 9: 1657-1660.
- [52] Kris-Etherton, P. M., Hecker, K. D., Bonanome, A., Coval, S. M., Binkoski, A. E., Hilpert, K. F., et al. (2002). "Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular diseases and cancer." American Journal of Medicine, 113, 71S-88S
- [53] Porrini M., Riso P., Brusamolino A., Berti C., Guarnieri S., Visioli F., "Daily intake of a formulated tomato drink affects carotenoid plasma and lymphocyte concentrations and improves cellular antioxidant protection". Br J Nutr 2005, 93(1), 93-9;
- [54] Yao L.H., Jiang Y.M., Shi J., Tomas-Barberan F.A, Datta N., Singanusong R., Chen S.S., "Flavonoids in food and their health benefits". Plant food Hum Nutr 2004, 59 (3); 113-22
- [55] Rahaman I., Biswas S.K., Kirkham P. A., "Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols". Biochem Pharmacol. 2006, 72, 1439-52
- [56] Sang S., Hou Z., Lambert J.D., Yang C.S., "Redox properties of tea polyphenols and related biological activities". Antioxidant Redox Signal 2005,7, 1704-14

- [57]Gusman J., Malonne H., Atassi G., “*A reappraisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol.*” *Carcinogenesis* 2001, 22, 1111-17.
- [58] Jang M., Cai L., Udeani G.O., Slowing K.V., Thomas C.F., Beecher C. W., Fong H.H., Farnsworth N.R., Kinghorn A.D., Mehta R.G., Moon R.C., Pezzuto J.M., “*Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes.*” *Science* 1997, 275,218-220
- [59] Kelloff G.J., Crowell J.A., Steele V.E., Lubet R.A., Mallone W.A., Boone C.W., Kopelovich L., Hawk E.T., Lieberman R., Lawrence J.A., Ali I., Viner J.L., Sigman C.C., “*Progress in cancer chemoprevention : development of diet-derived chemopreventive agents.*” *J Nutr* 2000, 130, 467S-471S.
- [60] Adams L.S., Chen S. “*Phytochemicals for breast cancer prevention by targeting aromatase.*” *Front. Biosci.* 2009, 14: 3846-3863
- [61]Khan S.G., Katiyar S.K., Agarwal R., Mukhtar H. “*Enhancement of antioxidant and phase II enzymes by oral feeding of green tea polyphenols in drinking water to SKH-1 hairless mice: Possible role in cancer chemoprevention.*” *Cancer Res.* 1992, 52: 4050-4052.
- [62] Fang J.Y., Richardson B.C. “*The MAPK signalling pathways and colorectal cancer.*” *Lancet Oncol.* 2005, 6: 322-327.
- [63] Sebolt-Leopold J.S., Herrera R. “*Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer.*” *Nat. Rev. Cancer* 2004, 4: 937-947
- [64] Tsatsanis C., Androulidaki A., Venihaki M., Margioris A.N. “*Signalling networks regulating cyclooxygenase-2.*” *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2006, 38: 1654-1661.
- [65] Fernandez-Penchon, M. S., Villano, D., Troncoso, A. M., & Garcia-Parrilla, M. C. (2008). “*Antioxidant activity of phenolic compounds: From in vitro to in vivo evidence.*” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48, 649–671.
- [66] Loo G., “*Redox-sensitive mechanism of phytochemical-mediated inhibition of cancer cell proliferation (review).*” *J. Nutr. Biochem.* 2003, 14(2), 64-73.
- [67] D’archivio M., Santangelo C., Scazzocchio B., Vari R., Filesì C., Masella R., Giovannini C., “*Modulatory effects of poliphenols on apoptosis induction: relevance for cancer prevention.*” *Int J. Mol Sci.* 2008, 9, 213-228.
- [68] Ramos S., “*Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention.*” *J. Nutr. Biochem.* 2007, 18(7), 427-42
- [69] Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: “*Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties.*” *Molecules* 2010; 15:7313–7352.

- [70] Visioli F, Galli C. "*Olive oil polyphenols and their potential effects on human health*". J Agric Food Chem 1998; 46:4292–4296.
- [71] M. I. Covas. "*Bioactive effects of olive oil phenolic compounds in humans: reduction of heart disease factors and oxidative damage.*" Inflammopharmacology 16 2008 216–218. Review
- [72] Montserrat Fito', Rafael de la Torre and Maria-Isabel Covas. "*Olive oil and oxidative stress*" Mol. Nutr. Food Res. 2007, 51, 1215 – 1224.
- [73] Fito', M., Covas, M. I., Lamuela-Raventós, R. M., Vila, J., et al., "*Protective effect of olive oil and its phenolic compounds against low density lipoprotein oxidation.*" Lipids 2000; 35, 633–638.
- [74] Masella, R., Vari, R., D'Archivio, M., Di Benedetto, R., et al., "*Extra virgin olive oil biophenols inhibit cell-mediated oxidation of LDL by increasing the mRNA transcription of glutathione-related enzymes*". J. Nutr. 2004; 134, 785–791.
- [75] Waterman, E., & Lockwood, B. (2007). "*Active components and clinical applications of olive oil*". Alternative Medicine Reviews, 12, 331–342.
- [76] Fitò, M., de la Torre, R., Farré-Albaladejo, M., Khymenetz, O., Marrugat, J., & Covas, M. I. (2007). "*Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenolic compounds in humans: A review.*" Annali dell'Istituto Superiore di Sanità, 43, 375–381
- [77] Manna C., Galletti P., Cucciolla V., Moltedo O., Leone A., Zappia V., 1997: "*The protective effect of the olive oil polyphenol (3,4-dihydroxyphenyl)-ethanol counteracts reactive oxygen metabolite-induced cytotoxicity in CaCo-2 cells*". J. Nutr. 127,286-292
- [78] Ilavarasi K., Kiruthiga P.V., Pandian S.K., Devi K.P., (2011): "*Hydroxytyrosol, the phenolic compound of olive oil protects human PBMC against oxidative stress and DNA damage mediated by 2,3,7,8-TCDD*". Chemosphere 84, 888-893
- [79] Devi K.P., Kiruthiga P.V., Pandian S.K., Archunan G., Shamnugam V.M., Arun S., (2008): "*Olive oil protects rat liver microsomes against benzo[a]pyrene induced damages-an in vitro study.*" Mol Nutr. Food Res. 52, S95-S102.
- [80] Zhang X., Jliang L., Genge C., Yoshimura H., Zhong L., 2008 : "*Inhibition of acrylamide genotoxicity in human liver-derived HepG2 cells by the antioxidant hydroxytyrosol*". Chem.Biol. Interact. 176, 173-178
- [81] Rietjens S.J., Bast A., Vente J.D., Haenen G.R.M.M., 2006: "*The olive oil antioxidant Hydroxytyrosol efficiently protects against the oxidative stress-induced impairment of the NO· response of isolated rat aorta*". Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 292,1931-1936

- [82] Fabiani R. Bartolomeo A.D., Rosignoli P., Servili M., Montedoro G.F., Morozzi G., 2002 : “*Cancer chemoprevention by hydroxytyrosol isolated from virgin olive oil through G1 cell cycle arrest and apoptosis*”. Eur J. Cancer Prevent 11, 351-358
- [83] Fabiani R. Bartolomeo A.D., Rosignoli P., Servili M., Selvaggini R., Montedoro G.F., Saverio D. C., Morozzi G., 2006: “*Virgin olive oil phenols inhibit proliferation on human promyelocytic leukemia cells (HL60) by inducing apoptosis and differentiation*” J. Nutr 136, 614-619
- [84] Aggarwal, B. B., & Shishodia, S. (2006). “*Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer*”. Biochemical Pharmacology, 71, 1397–1421.
- [85] Wang W., Heideman L., Chung C.S., Pelling J.C., Koehler K.J., Birt, D.F. “*Cell-cycle arrest at G2/M and growth inhibition by apigenin in human colon carcinoma cell lines.*” Mol. Carcinog. 2000, 28: pp102-110.
- [86] Mantena S.K., Baliga M.S., Katiyar, S.K. “*Grape seed proanthocyanidins induce apoptosis and inhibit metastasis of highly metastatic breast carcinoma cells*”. Carcinogenesis 2000, 27: pp1682-1691.
- [87] Fini L., Hotchkiss E., Fogliano V., Graziani G., Romano M., De Vol E.B., Qin H., Selgrad M., Boland C.R. Ricciardiello L. “*Chemopreventive properties of pinoresinol-rich olive oil involve a selective activation of the ATM-p53 cascade in colon cancer cell lines.*” Carcinogenesis 2008, 29: 139-146.
- [88] Adams L.S., Chen S. “*Phytochemicals for breast cancer prevention by targeting aromatase*”. Front. Biosci. 2009, 14: 3846-3863
- [89] Zhao B. “*Natural antioxidants protect neurons in Alzheimer’s disease and Parkinson’s disease*”. Neurochem Res 2009; 34:630–638.
- [90] D.K.W. Wang, C. C. Austin,; “*Determination of complex mixtures of volatile organic compounds in ambient air: an overview*” Anal Bioanal Chem (2006) 386: 1089–1098
- [91] Atkinson R, Arey J (2003) Chem Rev 103:4605–4638
- [92] Brasseur G, Atlas E, Erickson D, Fried A, Greenberg J, Guenther A, Harley P, Holland E, Klinger L, Ridley B, Tyndall G (1998) “*Trace gas exchanges and biogeochemical cycles. In: Atmospheric chemistry and global change*” Oxford University Press, New York, Ch 5, pp 189–242
- [93] Greenberg JP, Guenther A, Zimmerman P, Baugh W, Geron C, Davis K, Helmig D, Klinger LF (1999) Atmos Environ 33:855–867
- [94] Singh HB, Zimmerman P “*Atmospheric distribution and sources of nonmethane hydrocarbons.*” In: Nriagu JD (ed) Gaseous pollutants: characterization and cycles. Wiley, New York, (1992); pp 117–235

- [95] WHO (1987) *"Air quality guidelines for Europe"*. World Health Organisation Regional Publications, Copenhagen, Denmark
- [96] NRC (1991) *"Committee on tropospheric ozone formation and measurement: Rethinking the ozone problem in urban and regional air pollution."* National Academy Press, Washington, DC
- [97] UN-ECE (1991) Protocol to the 1979 *"Convention on longrange transboundary air pollution concerning the control of emissions of volatile organic compounds or their transboundary fluxes."* United Nations Economic Commission for Europe, Geneva
- [98] PORG (1997) *"Ozone in the United Kingdom: Fourth report of Photochemical Oxidants"* Review Group. Department of the UK the Environment, Transport and the Regions, London
- [99] Jenkin ME, Clemitshaw KC (2000) *Atmos Environ* 34 (16):2499–2527
- [100] Sillman S (1999) *Atmos Environ* 33:1821–1845
- [101] Derwent RG, Simmonds PG, S OD, Ryall DB (1998) *Atmos Environ* 32:3689–3702
- [102] EPA (1990) *"Cancer risk from outdoor exposure to air toxics."* U.S. Environmental Protection Agency
- [103] Molhave L, Nielsen GD (1992) *Indoor Air* 2:65–777
- [104] Molhave L, Gronkjaer J, Larsen S (1991) *Atmos Environ A–Gen* 25:1283–1293
- [105] IARC, *"Some industrial chemicals. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans"*, 1994; 60th International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- [106] Osterman-Golkar, S., Bond, J.A., 1996. Biomonitoring of 1,3-butadiene and related compounds. *Environmental Health Perspective* 104, 907-715.
- [107] Gervasi, P.G., Longo, V.. *"Metabolism and mutagenicity of isoprene."* *Environmental Health Perspective* 1990; 86, 85-87.
- [108] Adler, I.D., Kliesch, U., Nylund, L., Peltonen, K.,. *"In vitro and in vivo mutagenicity of the butadiene metabolites butadiene diolepoxide, butadiene monoepoxide and diepoxybutane."* *Mutagenesis*, 1997;12, 339-345
- [109] Sisiadek, M., Järventaus, H., Sorsa, M., *"Sister-chromatid exghange induced by 1,3-butadiene and its epoxides in CHO cells"*. *Mutation Research*, 1991; 263, 47-50
- [110] Kligerman, A.D., Hu, Y.,. *"Some insights into the mode of action of butadiene by examining the genoroxicity of its metabolites."* *Chemico-Biological Interaction* 2007;166, 132-139.

- [111] Anderson, D., Dobrzynska, M.M., Basaran, N.,. “*Effects of various genotoxins and reproductive toxins in human lymphocytes and sperm in the Comet assay.*” Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis, 1997; 17, 29-43
- [112] Kolman, A., Spivak, I., Näslund, M., Dusinská, M., Cedervall, B.. “*Propylene oxide and epichlorohydrin induce DNA strand breaks in human diploid fibroblast.*” Environmental and Molecular Mutagenesis 1997, 30, 40-46
- [113] Cemeli E., Mirkova E., Chiuchiarelli G., Alexandrova E., Anderson D., “*Investigation on the mechanisms of genotoxicity of butadiene, styrene and their combination in human lymphocytes using the Comet assay*” Mutation Research 664 (2009) 69–76
- [114] Fabiani, R., Rosignoli, P., De Bartolomeo, A., Fuccelli, R., Morozzi, G. “*DNA-damaging ability of isoprene and isoprene mono-epoxide (EPOX I) in human cells evaluated with the comet assay*”. Mutation Research 2007; 629, 7-13.
- [115] Holzer, J., Voss, B., Karroum, S., Hildmann, H., Wilhelm, M.. “*A comparative study of chemically induced DNA damage in isolated nasal mucosa cells of human and rats assessed by the alkaline comet assay.*” Journal of Toxicology and Environmental Health 2008; 71, 936-946.
- [116] International Agency for Research on Cancer (IARC), “*1,3- Butadiene,*” IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 71 (1999)109–225
- [117] G. Matanoski, E. Elliot, X. Tao, M. Francis, A. Correa-Villasenor, C. Santos-Burgoa, “*Lymphohematopoietic cancers and butadiene and styrene exposure in synthetic rubber manufacture,*” Ann. N.Y. Acad. Sci. 837 (1997) 157–169.
- [118] L. Moller, D. Schueltze, H. Autrup, “*Future research needs associated with the assessment of potential human health risks from exposure to toxic ambient air pollutants,*” Environ. Health Perspect. (1994); 102 (Suppl. 4) 193–210.
- [119] R.L. Melnick, J. Huff, B.J. Chou, R.A. Miller, “*Carcinogenicity of 1,3-butadiene in C57BL/6xC3HF1 mice at low exposure concentrations,*” Cancer Res. 50 (1990) 6592–6599
- [120] P.E. Owen, J.R. Gleister, “*Inhalation toxicity and carcinogenicity of 1,3-butadiene in Sprague–Dawley rats,*” Environ. Health Perspect. 86 (1990) 19–25.
- [121] M.A. Jackson, H.F. Stack, J.M. Rice, M.D. Waters, “*A review of the genetic and related effects of 1,3-butadiene in rodents and humans,*” Mutat. Res. 463 (2000) 181–213.
- [122] P. Koivisto, I.D. Adler, F. Pacchierotti, K. Peltonen, “*DNA adducts in mouse testis and lung after inhalation exposure to 1,3- butadiene*”, Mutat. Res. 397 (1998) 3–10.

- [123] C. Zhao, M. Koskinen, K. Hemminki, “*³²P-postlabelling of N6- adenine adducts of epoxybutanediol in vivo after 1,3-butadiene exposure*”, *Toxicol. Lett.* 28 (1998) 591–594.
- [124] E.D. Booth, J.D. Kilgour, S.A. Robinson, W.P. Watson, “*Dose responses for DNA adduct formation in tissues of rats and mice exposed by inhalation to low concentrations of 1,3- [2,3-¹⁴C]-butadiene*”, *Chem. Biol. Interact.* 147 (2004) 195–211.
- [125] I.D. Adler, U. Kliesch, L. Nylund, K. Peltonen, “*In vitro and in vivo mutagenicity of the butadiene metabolites butadiene diolepoxide, butadiene monoepoxide and diepoxybutane*”, *Mutagenesis* 12 (1997) 339–345.
- [126] G.L. Erexson, K.R. Tindall, “*Micronuclei and gene mutations in transgenic Big Blue mouse and rat fibroblasts after exposure to the epoxides metabolites of 1,3-butadiene*”, *Mutat. Res.* 472 (2000) 105–117.
- [127] M.C. Kohn, R.L. Melnick, “*Species differences in the production and clearance of 1,3-butadiene metabolites: a mechanistic model indicates predominantly physiological, not biochemical, control*”, *Carcinogenesis* 14 (1993) 619–628.
- [128] W.W. Au, W.E. Bechtold, E.B. Whorton Jr., M.S. Legator, “*Chromosome aberrations and response to gamma-ray challenge in lymphocytes of workers exposed to 1,3-butadiene*”, *Mutat. Res.* 334 (1995) 125–130.
- [129] S.Z. Abdel-Rahman, R.A. El-Zein, M.M. Ammenhauser, Z.Yang, T.H. Stock, M. Morandi, J.B. Ward Jr., “*Variability in human sensitivity to 1,3-butadiene: influence of allelic variants of the microsomal epoxides hydrolase gene*”, *Environ. Mol. Mutagen.* (2003) 41 140–146
- [130] R.J. Sram, P. Rossner, K. Peltonen, K. Podrazilova, G. Mrackova, N.A. Demopoulos, G. Stephanou, D. Vlachodimitropoulos, F. Darroudi, A.D. Tate, “*Chromosomal aberrations, sisterchromatid exchanges, cells with high frequency of SCE, micronuclei and comet assay parameters in 1,3-butadiene-exposed workers,*” *Mutat. Res.* (1998) 419 145–154.
- [131] Avel Vodicka, Rudolf Stetina, Petr Smerak, Ludmila Vodickova ,Alessio Naccarati “*Micronuclei, DNA single-strand breaks and DNA-repair activity in mice exposed to 1,3-butadiene by inhalation*” *Mutation Research* (2006); 608 49–57
- [132] A.D. Tate, F.J. van Dam, F.A. de Zwart, F. Darroudi, A.T. Natarajan, P. Rossner, K. Peterkova, K. Peltonen, N.A. Demopoulos, G. Stephanou, D. Vlachodimitropoulos, R.J. Sram, “*Biological effect monitoring in industrial workers from the Czech Republic exposed to low levels of butadiene*”, *Toxicology* (1996); 113 91–99.

- [133] Hirvonen A. "Combinations of susceptible genotypes and individual responses to toxicants", *Environ Health Perspect* (1997);105 (Suppl 4):1-4
- [134] Idle JR. "Is environmental carcinogenesis modulated by host polymorphism?", *Mutat Res* 24:259-266 (1991).
- [135] Radim J. Gram "Effect of Glutathione Stransferase M1 Polymorphisms on Biomarkers of Exposure and Effects *Environmental Health Perspectives*" Vol 106, Supplement 1 February 1998
- [136] Steele DH, Thornburg MJ, Stanley JS, et al. "Determination of styrene in selected foods". *J Agric Food Chem* 1994;42:1661-5.
- [137] Hodgson AT, Wooley JD, Daisey JM. "Emissions of volatile organic compounds from new carpets measured in a large-scale environmental chamber". *J Air Waste Manage Assoc* 1993;43:316-24.
- [138] Kolstad H.A., Lynge E., Olsen J., Breum N., "Incidence of lymphohematopoietic malignancies among styrene- exposed workers of the reinforced plastics industry". *Scand. J. Work Environ. Health* 1994; 20, 272-278.
- [139] Newhook, R., Meek, M.E., Savard, S., Caldwell, I., Dormer, W., "Styrene: evaluation of risks to health from environmental exposure in Canada", *Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* 1994; C12, 453-471.
- [140] Nakajima, T., Elovaara, F., Gonza'lez, F.J., Gelvoin, H.V., Raunio, H., Pelkonen, O., Vainio, H., Aoyama, T.,. "Styrene metabolism by cDNA-expressed human hepatic and pulmonary cytochromes P450". *Chem. Res. Toxicol.* 1994; 7, 891-896.
- [141] Kim, H., Wang, R.S., Elovaara, E., Raunio, H., Pelkonen, O., Aoyama, T., Vainio, H., Nakajima, T., "Cytochrome p450 isozymes responsible for the metabolism of toluene and styrene in human liver microsomes". *Xenobiotica* 1997;27, 657-665.
- [142] Nakajima T, Wang RS, Elovaara E, et al. "CYP2C11 and CYP2B1 are major cytochrome P450 forms involved in styrene oxidation in liver and lung microsomes from untreated rats, respectively". *Biochem Pharmacol* 1994;48:637-42
- [143] Sumner JS, Fennell TR. "Review of the metabolic fate of styrene". *Crit Rev Toxicol* 1994;24:S11-33
- [144] Barale, R., "The genetic toxicology of styrene and styrene oxide". *Mutat. Res.* 1991, 257, 107-126.
- [145] Wong, O., "A cohort mortality study and a case-control study of workers potentially exposed to styrene in the reinforced plastics and composites industry", *Br. J. Ind. Med.* 1990; 47, 753-76

- [146] Scott, D., Preston, R.J., "A re-evaluation of the cytogenetic effects of styrene", *Mutat. Res.* 1994, 318, 175–203
- [147] Bastlova, T., Vodicka, P., Peterkova, K., Hemminki, K., Lambert, B., "Styrene oxide-induced HPRT mutations, DNA adducts and DNA strand breaks in cultured human lymphocytes", *Carcinogenesis* 1995, 16, 2357–2362
- [148] Laffon, B., Pasaro, E., Mendez, J., "Effects of styrene- 7,8-oxide over p53, p21, bcl-2 and bax expression in human lymphocyte cultures". *Mutagenesis* 2001, 16, 127–132.
- [149] Brasseur G, Atlas E, Erickson D, Fried A, Greenberg J, Guenther A, Harley P, Holland E, Klinger L, Ridley B, Tyndall G "Trace gas exchanges and biogeochemical cycles. In: *Atmospheric chemistry and global change*", Oxford University Press, New York, (1998) Ch 5, pp 189–242
- [150] Anderson, D., Dobrzynska, M.M., Basaran, N., "Effects of various genotoxins and reproductive toxins in human lymphocytes and sperm in the Comet assay", *Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis*, (1997)17, 29-43
- [151] Somorovska M, Jahnova E, Tulinska J, et al. "Biomonitoring of occupational exposure to styrene in a plastics lamination plant." *Mutat Res* 1999;428:255–69.
- [152] G. Matanoski, E. Elliot, X. Tao, M. Francis, A. Correa-Villasenor, C. Santos-Burgoa, "Lymphohematopoietic cancers and butadiene and styrene exposure in synthetic rubber manufacture", *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 837 (1997) 157–169
- [153] Katoh T., Higashi K., Inoue N. "Sub-chronic effects of styrene and styrene oxide on lipid peroxidation and the metabolism of glutathione in rat liver and brain." *J Toxicol Sci* (1989); 14: 1–9.
- [154] Marczynski B., Rozynek P., Elliehausen H.-J., Korn M., Baur X. "Detection of 8-hydroxydeoxyguanosine, a marker of oxidative DNA damage, in white blood cells of workers occupationally exposed to styrene." *Arch Toxicol* 1997; 71: 496–500.
- [155] L. Moller, D. Schueltze, H. Autrup, "Future research needs associated with the assessment of potential human health risks from exposure to toxic ambient air pollutants", *Environ. Health Perspect.* 102 (Suppl. 4) (1994) 193–210.
- [156] M.A. Jackson, H.F. Stack, J.M. Rice, M.D. Waters, "A review of the genetic and related effects of 1,3-butadiene in rodents and humans", *Mutat. Res.* 463 (2000) 181–213
- [157] Boyum A. "Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood". *Scand J Clin Lab Invest.* 1968;21:77–89.

- [158] Fabiani R, De Bartolomeo A, Rosignoli P, Morozzi G. “*Antioxidants prevent the lymphocyte DNA damage induced by PMA-stimulated monocytes*”. *Nutr Cancer*. 2001;39(2):284-91.
- [159] Hussain RF, Nouri AM, Oliver RT. “*A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay*”. *J Immunol Methods* 1993;160:89-96
- [160] Hoorens, A.; Van de Castele, M.; K€oppel, G.; Pipeleers, D. *Glucose promotes survival of rat pancreatic beta cells by activating synthesis of proteins which suppress a constitutive apoptotic program*. *J. Clin. Invest.* 1996, 98, 1568–1574
- [161] Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. “*A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells*”. *Exp Cell Res*. 1988;175:184–91.
- [162] Collins AR, Ai-guo M, Duthie SJ. “*The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells*”. *Mutat Res*. 1995;336:69–77.
- [163] LeBel CP, Ischiropoulos H, and Bondy SC (1992) “*Evaluation of the probe 2,7-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress*”. *Chem Res Toxicol* 5:227–231
- [164] Nourooz-Zadeh, J., Tajaddini-Sarmadi, J., Wolff, S. P., (1994,) “*Measurement of plasma hydroperoxide concentration by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine*.” *Anal. Biochem.* 220, 403–409.
- [165] Fabiani R, Rosignoli P, De Bartolomeo A, Fuccelli R, Morozzi G. (2008) “*Inhibition of cell cycleprogression by hydroxytyrosol is associated with upregulation of cyclin-dependent protein kinase inhibitors p21^{WAF/ Cyp} and p27^{Kip} and with the induction of differentiation in HL60 cells*.” *J Nutr.* Aug;138(8):1411-6
- [166] Cobrinik D. “*Pocket proteins and cell cycle control*”. *Oncogene*. 2005;24: 2796–809.
- [167] Covas MI, de la Torre K, Farre´-Albadalejo M, Kaikkonen J, Fito´ M, Lopez-Sabater C, Pujadas-Bastardes MA, Joglar J, Weinbrenner T, et al. (2006) “*Postprandial LDL phenolic content and LDL oxidation are modulated by olive oil phenolic compounds in human*.” *Free Radic Biol Med.*; 40:608–16.
- [168] Visioli F, Bellomo G, Galli C. (1998) “*Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols*.” *Biochem Biophys Res Commun.* ;247:64–64.
- [169] Fabiani R, De Bartolomeo A, Rosignoli P, Morozzi G. (2001) “*Antioxidants prevent the lymphocyte DNA damage induced by PMA-stimulated monocytes*”. *Nutr Cancer.* ;39:284–91.

- [170] Rice-Evans CA, Miller JN, Paganga G. (1996) "*Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids.*" *Free Radic Biol Med.* ;20:933–56.
- [171] Rietjens SJ, Bast A, Haenen GRMM. (2007) "*New insights into controversies on the antioxidant potential of the olive oil antioxidant hydroxytyrosol.*" 55:7609–14.
- [172] O'Dowd Y, Driss F, My-Chan Dang P, Albim C, Gougerot-Pocidalo MA, Pasquier C, El-Benna J. (2004) "*Antioxidant effect of hydroxytyrosol, a polyphenol from olive oil: scavenging of hydrogen peroxide but not superoxide anion produced by human neutrophils.*" 68:2003–8.
- [173] Salomon, J.J., (1999). "*Cyclic adducts and intermediates induced by simple epoxides.*" IARC Scientific Publications 150, 123-135
- [174] Koskinen, M., Plnà, K. (2000). "*Specific DNA adducts by some mono-substituted epoxides in vitro and in vivo.*" *Chemico-Biological Interaction*, 129, 209-229.
- [175] Speit, G., Hartaman, A. (2006) "*The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair.*" *Methods in Molecular Biology*, 314, 275-286.
- [176] Fortini, P., Raspaglio, G., Falchi, M., Dogliotti, E. (1996) "*Analysis of DNA alkylation damage and repair in mammalian cells by the comet assay.*" *Mutagenesis* 11, 169-175.
- [177] Vettori, M.V., Caglieri, A., Goldoni, M., Castaldi, A.F., Darè, E., Alinovi, R., Beccatelli, S., Mutti, A., 2005. "*Analysis of oxidative stress in SK-N-MC neurons exposed to styrene-7,8-oxide.*" *Toxicology in Vitro*, 19, 11-20.
- [178] Yadavilli, S., Martinez-Ceballos, E., Snowden-Aikens, J., Hurst, A., Joseph, T., Albrecht, T., Muganda, P.M. 2007. "*Diepoxybutane activates the mitochondrial apoptotic pathway and mediates apoptosis in human lymphoblasts through oxidative stress.*" *Toxicology in Vitro*, 21, 1429-1441.
- [179] Sathiakumar, N., Delzell, E., Hovinga, M., Macaluso, M., Julian, J.A., Larson, R., Cole, P., Muir, D.C. 1998. "*Mortality from cancer and other causes of death among synthetic rubber workers. Occupational and Environmental*" *Medicine*, 55, 230-235.
- [180] Straif, K., Weiland, S.K., Werner, B., Chambless, L., Mundt, K.A., Keil, U., 1998. "*Workplace risk factors for cancer in the German rubber industry:*" Part 2. Mortality from non-respiratory cancers. *Occupational and Environmental Medicine* 55, 325-332.

- [181] Laffon, B., Pásaro, E., Méndez, J. 2002. “DNA damage and repair in human leucocytes exposed to styrene-7,8-oxide measured by the comet assay.” *Toxicology Letters*, 126, 61-68.
- [182] Ward, E.M., Sculte, P.A., Straif, K., Hopf, N.B., Caldwell, J.C., Carreón, T., DeMarini, D.M., Fowler, B.A., Goldstein, B.D., Hemminki, K., Hines, C.J., Pursiainen, K.H., Kuempel, E., Lewtas, J., Lunn, R.M., Lynge, E., McElvenny, D.M., Muhle, H., Nakajima, T., Robertson, L.W., Rothman, N., Ruder, A.M., Schubauer-Berigan, M.K., Siemiatycki, J., Silverman, D., Smith, M.T., Sorahan, T., Steenland, K., Stevens, R.G., Vineis, P., Zahm, S.H., Zeise, L., Coglianò, V.J. 2010. “Research recommendations for selected IARC”-classified agents. *Environmental Health Perspective*, 118, 1355-1362.
- [183] Rudel, R.A., Attfield, K.R., Schifano, J.N., Brody, J.G. 2007. “Chemicals causing mammary gland tumors in animals signal new directions for epidemiology, chemicals testing, and risk assessment for breast cancer prevention”. *Cancer* 109, 2635-2666.
- [184] De Flora S., Izzotti A., D’agostini F., Balansky M.R., 2001 “Mechanism of N-acetyl-cysteine on the prevention of DNA damage and cancer, with special reference to smoking related end-point.” *Carcinogenesis* 22 (7) 999-1013
- [185] Barale, R., “The genetic toxicology of styrene and styrene oxide”. *Mutat. Res.* 1991, 257, 107–126.
- [186] Scott, D., Preston, R.J., “A re-evaluation of the cytogenetic effects of styrene”, *Mutat. Res.* 1994, 318, 175–203
- [187] Bastlova T., Vodicka P., Peterkova K., Hemminki K., Lambert B. “Styrene oxide-induced HPRT mutations, DNA adducts and DNA strand breaks in cultured human lymphocytes. *Carcinogenesis*” 1995; 16: 2357–2362.
- [188] Vodicka P., Bastlova T., Vodickova L., Peterkova K., Lambert B., Hemminki K. “Biomarkers of styrene exposure in lamination workers: levels of O6-guanine DNA adducts, DNA strand breaks and mutant frequencies in the hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase gene in T-lymphocytes.” *Carcinogenesis* 1995; 16: 1473–1481
- [189] Walles S. A. S., Orsen I. “Single-strand breaks in DNA of various organs of mice induced by styrene and styrene oxide”. *Cancer Lett* 1983; 21: 9–15
- [190] D. Tang, D.H. Phillips, M. Stampfer, L.A. Mooney, Y. Hsu, S. Cho, W.Y. Tsai, J. Ma, K.J. Cole, M.N. She, F.P. Perera, (2001) “Association between carcinogen-DNA adducts in white blood cells and lung cancer risk in the physicians health study”, *Cancer Res.* 61 6708–6712.

- [191] Sakihama, Y., Cohen, M. F., Grace, D. S., Yamasaki, H., “*Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: Phenolics induced oxidative damage mediated by metals in plant.*” *Toxicology* 2002, 177, 67–80.
- [192] Sergediene, E., J_nsson, K., Szymusiak, H., Tyrakowska, B., et al., “*Prooxidant toxicity of polyphenolic antioxidant to HL-60 cells: Description of quantitative structure-activity relationships.*” *FEBS Lett.* 1999, 462, 392–396.
- [193] Heiss, E., Schilder, Y. D. C., Dirsch, V. M., “*Chronic treatment with resveratrol induces redox stress- and ataxia telangiectasia- mutated (ATM)-dependent senescence in p53-positive cancer cells.*” *J. Biol. Chem.* 2007, 282, 26759–26766.
- [194] Azmi, A. S., Bhat, S. H., Hanif, S., Hadi, S. M., “*Plant polyphenols mobilize endogenous copper in human peripheral lymphocytes leading to oxidative DNA breakage: A putative mechanism for anticancer properties.*” *FEBS Lett.* 2006, 580, 533–538.
- [195] Yang, G. Y., Liao, J., Li, C., Chung, J., et al., “*Effect of black and green tea polyphenols on c-Jun phosphorylation and H₂O₂ production in transformed and non-transformed human brochial cell lines: Possible mechanisms of cell growth inhibition and apoptosis induction.*” *Carcinogenesis* 2000, 21, 2035–2039.
- [196] Nakagawa, H., Hasumi, K., Woo, J. T., Nagai, K., Wachi, M., 2004 “*Generation of hydrogen peroxide primarily contributes to the induction of Fe(II)-dependent apoptosis in Jurkat cells by (–)-epigallocatechin gallate.*” *Carcinogenesis*, 29, 1567 – 1574.
- [197] Elbling, L., Weiss, R. M., Teufelhofer, O., Uhl, M., et al., 2004 “*Green tea extract and (–)-epigallocatechin-3-gallate, the major tea catechin, exert oxidant but lack antioxidant activities.*” *FASEB J.* 2005, 19, 807–809.
- [198] Della Ragione, F., Cucciolla, V., Criniti, V., Indaco, S., et al., 2002 “*Antioxidants induce different phenotypes by a distinct modulation of signal transduction.*” *FEBS Lett.*, 532, 289 –294.
- [199] Katiyar S., Afaq F., Azizuddin K., Mukthar H., “*Inhibition of UVB-induced oxidative stress –mediated phosphorylation of mitogen –activated protein kinase pathways in cultured human epidermal keratinocytes by green tea polyphenol(-) epigallocatechin-3-gallate.*” *Toxicol Appl Pharmacol* 2001, 176(2) , 110-7.