

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELLA TUSCIA

**DOTTORATO DI RICERCA IN
GENETICA E BIOLOGIA CELLULARE**

XVIII ciclo

2003/2005

**“Meccanismi coinvolti nell’effetto pro-apoptotico
dell’Acido Docosaesaenoico (DHA) nella linea cellulare di
adenocarcinoma pancreatico umano PaCa-44.”**

DOTTORANDA

Dr.ssa Barbara Loppi

TUTOR

Dr. Nicolò Merendino

COORDINATORE DEL CORSO DI DOTTORATO

Prof. Luigi Bosco

Laboratorio di Nutrizione Molecolare e Cellulare

INDICE

SINTESI	Pag.1
§ 1. INTRODUZIONE	Pag.3
1.1 Aspetti nutrizionali del Cancro	Pag.3
1.2 Acidi Grassi omega-3	Pag.7
1.3 Acido Docosaesaenoico (DHA, C22:6, n-3)	Pag.14
1.4 Lipossigenasi (LOXs) e Ciclossigenasi (COXs)	Pag.33
1.5 Adenocarcinoma Pancreatico	Pag.42
1.6 Apoptosi	Pag.46
1.7 Apoptosi e Cancro	Pag.59
§ 2. SCOPO DEL LAVORO	Pag.62
§ 3. MATERIALI E METODI	Pag.64
§ 4. RISULTATI	Pag.77
§ 5. DISCUSSIONE	Pag.103
§ 6. BIBLIOGRAFIA	Pag.110

SINTESI

Gli acidi grassi poliinsaturi (PUFAs) sembrano avere effetti anti-proliferativi e pro-apoptotici in una ampia gamma di cellule tumorali anche se i meccanismi attraverso cui si esplica tale azione non sono ancora del tutto chiariti. In questo lavoro è stato studiato sia l'effetto pro-apoptotico dell'acido grasso poliinsaturo docosaesaenoico (DHA, C22:6 n-3) sia i meccanismi da esso mediati, utilizzando come modello sperimentale la linea cellulare di adenocarcinoma pancreatico umano PaCa-44. Trattamenti con acido butirrico (BA, C4:0), acido oleico (OA, C18:1), acido linoleico (LA, C18:2 n-6) e DHA alla concentrazione di 200 μ M hanno evidenziato che tutti gli acidi grassi inibiscono la proliferazione, mentre solo il DHA ha indotto il processo apoptotico nella linea tumorale studiata. Sono stati quindi analizzati i meccanismi che mediano l'effetto pro-apoptotico del DHA. Utilizzando il probe DCFH-DA ed il saggio TBARs, sono stati evidenziati rispettivamente elevati livelli di ROS intracellulari e un incremento nella perossidazione lipidica (MDA) dopo trattamento con l'acido grasso. Inoltre alcuni composti antiossidanti come BHT, α -tocoferolo (Vitamina E) ed acido ascorbico (Vitamina C) hanno annullato l'effetto del DHA inibendo sia l'apoptosi sia la perossidazione lipidica. Questi dati hanno dimostrato che il processo di stress ossidativo è implicato nell'effetto pro-apoptotico mediato dal DHA. Nella morte cellulare indotta dall'acido grasso sembra inoltre essere coinvolta la molecola antiossidante glutatione (GSH), il quale, a seguito di trattamenti con l'acido grasso, viene trasportato all'esterno della cellula in forma ridotta. A riprova di questa osservazione l'uso di inibitori specifici dei trasportatori per GSH (metionina e cistationina) annulla l'effetto del DHA inibendo sia l'apoptosi sia la reazione di perossidazione lipidica. Il decremento di GSH intracellulare diminuisce l'attività dell'enzima glutatione perossidasi (GPx), GSH- e selenio-dipendente. L'aggiunta di selenio al medium di coltura ha

inibito non solo l'apoptosi, ma anche la disattivazione dell'enzima GPx, la perdita di GSH e la perossidazione lipidica, rendendo evidente il coinvolgimento di GPx nell'apoptosi DHA-indotta. E' stata infine investigata la possibilità che il DHA potesse modulare geneticamente il programma apoptotico agendo attraverso l'attivazione dei recettori nucleari Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs).

Cotrattamenti con DHA, Vitamina A (all-trans Retinoic Acid, at-RA) e Badge, (Bhisphenol A Diglycidyl Ether) inibitore dell'isoforma PPAR- γ , hanno evidenziato il coinvolgimento dei PPARs nell'apoptosi DHA-indotta. La regolazione dell'apoptosi da parte di tali recettori nucleari, sembra essere legata alla modulazione di geni che codificano per gli enzimi lipossigenasi (LOXs). A seguito di trattamento con DHA, infatti, l'espressione di tali enzimi viene modulata a seconda che essi svolgano rispettivamente funzioni anti-apoptotiche o pro-apoptotiche.

Questi dati quindi evidenziano che il DHA manifesta un effetto antiproliferativo e pro-apoptotico sulla linea cellulare presa in esame attraverso due meccanismi, uno ossidativo e l'altro genetico, ugualmente coinvolti nel processo di morte mediato dal DHA.

§ 1. INTRODUZIONE

1. 1 Aspetti nutrizionali del cancro

Studi epidemiologici supportati da dati sperimentali clinici *in vivo* e *in vitro* hanno contribuito ad individuare il potenziale legame tra la dieta, intesa come apporto giornaliero di fattori nutrizionali quali carboidrati, lipidi, proteine, vitamine e oligoelementi, e l'insorgenza e/o la prevenzione di patologie cancerose.

Anche se risulta piuttosto difficile quantificare esattamente il rischio associato ad ogni tipo di alimento nel favorire lo sviluppo del tumore o la possibilità che esso lo prevenga, vista la complessità degli elementi che entrano in gioco nell'eziogenesi delle neoplasie e l'elevato numero di sostanze di cui si compone la dieta, è tuttavia possibile affermare che la quota di tumori attribuibili alla dieta sia elevata e stimata intorno al 30% (dati OMS 1996, Key et al., 2002).Una delle prove a favore di questa, ormai quasi accertata, teoria è fornita dagli studi statistici di correlazione geografica che confrontano l'incidenza delle patologie cancerose in relazione alla diversa area geografica delle popolazioni in esame e come conseguenza alla diversa dieta. Le differenze, peraltro forti, riscontrate tramite questi studi evidenziano la maggiore suscettibilità di una popolazione rispetto ad altre allo sviluppo di particolari tipi di tumore; in Giappone, per esempio, il cancro allo stomaco è 25 volte più frequente che in Uganda, il tumore al colon negli Stati Uniti è 10 volte più diffuso che in Nigeria, il cancro epatico è 100 volte più presente in Mozambico che non in Inghilterra. A sostegno del fatto che la dieta influisca notevolmente sullo sviluppo e/o sulla prevenzione di malattie neoplastiche sopraggiungono anche le forti differenze percentuali che riguardano l'insorgenza di cancro tra le popolazioni indigene e gli emigranti, ad esempio,

nigeriani trapiantati negli Stati Uniti presentano una maggiore incidenza del tumore al colon rispetto alla popolazione del paese di origine, questo suggerisce che oltre ai fattori genetici anche quelli ambientali e nutrizionali possano essere determinanti nella variazione del tasso di comparsa di tali malattie.

Alcuni dati epidemiologici che legano fattori nutrizionali e cancro sono piuttosto consistenti con la teoria, evidenziando una correlazione diretta tra lo sviluppo dei tumori più diffusi, come il cancro del colon-retto, del rene, della prostata, della vescica, del fegato, e l'assunzione di particolari fattori nutrizionali quali grassi di origine animale, contenenti elevata quantità di alcuni lipidi saturi, colesterolo o alcool. L'alcool e i nutrienti suddetti possono influenzare la carcinogenesi a diversi livelli: (i) inducendo ossidazione cellulare, con relativi danni al materiale genetico; (ii) alterando la consistenza e la fluidità della membrana plasmatica con relativa variazione della recettività cellulare alle molecole di segnalazione esterne (ormoni, fattori di crescita, citochine); (iii) e modulando l'espressione genica; tutte modifiche che possono avere effetti diretti sui meccanismi di proliferazione e morte cellulare (Greenwald et al., 2001). Per contro ulteriori studi evidenziano una correlazione inversa tra l'assunzione di verdura, alimenti ricchi in fibre, frutta, cereali e il rischio di sviluppare malattie cancerose. La funzione di tali alimenti è principalmente quella di fornire ad ogni singola cellula una difesa contro l'inevitabile danno ossidativo, responsabile delle alterazioni a carico delle biomolecole che compongono e permettono la funzionalità cellulare (lipidi di membrana, proteine, lipoproteine, materiale genetico). Una dieta ricca di tali alimenti incrementa nell'organismo la presenza di composti quali tocoferoli, tocotrienoli, acido ascorbico, β -carotene, vitamina D, selenio, acido folico, calcio, fosforo che, oltre alle loro funzioni antiossidanti hanno anche la capacità di influenzare i programmi di trasformazione, proliferazione e morte cellulare (IARC Handbooks of Cancer Prevention 1998; Ogino et al., 1999;

Halliwell, 2000; Pinto et al., 1999; Platz et al., 1999; Van Poppel et al., 1997; Choi et al., 2000; Ganther, 1999; Holben et al. 1999; Azzi et al., 1997).

Di recente scoperta è che le funzioni anticancerogene che sviluppano gli alimenti di origine vegetale non sono da imputare solo al loro contenuto in composti antiossidanti ma anche alla presenza di composti chimicamente diversi quali, carotenoidi (luteina, β -criptoxantina, astaxantina), composti organo-solfati (solfato e disolfato di diallile, trisolfato di metil-allile), polifenoli (acido caffeico, acido idrossicinnamico o curcumina, quercitina, apigenina, naringina, esperindina, resveratrolo), fito-estrogeni (lignani ed isoflavoni) e terpeni (monoterpeni come limonene e geraniolo, e sesquiterpeni come farnesolo) che oltre alla loro funzione antiossidante, sono anche in grado di influenzare la progressione del ciclo cellulare, inibire l'adesione e l'invasione di cellule tumorali limitando le metastasi, ridurre la formazione di addotti DNA-carcinogeno, aumentare la comunicazione cellula-cellula, oltre che inibire il segnale di trasduzione (Beecher, 1999; Seki et al., 2000; Knowles, Milner, 2000; Zhu et al., 1999; Nomura et al., 2000; Sai et al., 2000; Schut, Yao, 2000; Damianaki et al., 2000; Wang et al., 1999; Wenzel et al., 2000; Xu et al., 2000; Salti et al., 2000; Sakamoto, 2000; Papazisis et al., 2000; Gamet-Payrastre et al., 2000; Meng et al., 2000; Mo, Elson, 1999).

Tra i fattori nutrizionali più interessanti in termini di relazione rischio di cancro e dieta sono sicuramente i grassi, sono numerosi infatti gli studi che testano i livelli di assunzione di lipidi, con distinzione per quantità (grassi totali) origine (animale o vegetale) e tipo (saturi, monoinsaturi e poliinsaturi), e l'insorgenza di patologie cancerose. Esperimenti *in vivo* su ratto hanno evidenziato che modificando la composizione dei grassi assunti dalla dieta è possibile alterare la percentuale di comparsa di tumori e disporre di una diversa suscettibilità ad essi (Kushi et al., 2002; Welsch, 1990; Freedman et al., 1992). Alle stesse conclusioni si giunge analizzando i dati ricavati da studi di popolazione condotti su scala internazionale che hanno come oggetto l'analisi

dell'insorgenza di patologie tumorali in relazione al consumo di grassi pro-capite.

I lipidi assunti tramite la dieta non sono solo studiati come possibili induttori del programma di carcinogenesi ma, dai dati di recente letteratura, sembra sempre più consistente l'idea che alcuni tipi di grassi abbiano la capacità di regolare e/o inibire l'insorgenza, la proliferazione e l'effetto metastasi di molti tipi di tumori, manifestando funzione preventive.

Oggetto di tali studi sono gli acidi grassi poliinsaturi essenziali (PUFAs) della serie n-3, il cui precursore, l'acido α -linolenico (LNA, 18:3, n-3), opportunamente metabolizzato, è trasformato in derivati secondari quali l'acido eicosapentenoico (EPA, 20:5, n-3) e l'acido docosaesaenoico (DHA, 22:6, n-3) che si manifestano come i composti più attivi della serie n-3. Il ruolo che tali acidi grassi derivati rivestono nell'eziologia di malattie cancerose è stato delineato da numerosi studi *in vivo* e *in vitro* che dimostrano come essi limitino lo sviluppo e/o inibiscano la crescita delle più comuni forme di patologie neoplastiche presentando proprietà preventive e soppressive nei confronti di tali malattie, rispetto ad altri tipi di acidi grassi o composti appartenenti alla stessa famiglia (Karmali et al., 1984; Lindner, 1991; Rose et al., 1991; Tsai et al., 1998; Boudreau et al., 2001; Narayanan et al., 2001; Rose et al., 1996).

1.2 Acidi grassi omega-3 (ω -3)

Gli omega-3 e i loro effetti sono stati oggetto di studio fin dai primi anni '70 quando Bang e Dyerberg (Bang et al., 1976; Dyerberg et al., 1978) evidenziarono una netta relazione tra la bassa incidenza di malattie cardiovascolari nelle popolazioni Inuit originarie della zona artica e la loro dieta basata essenzialmente sul pesce; tale popolazione consuma in media 10 gr di acidi grassi n-3 al giorno contro 1-2 gr/die consumati dalle restanti popolazioni. Da allora sempre più scienziati hanno indagato le proprietà benefiche di questi acidi grassi in relazione a diverse patologie, prima con particolare riferimento alle malattie cardiovascolari dove è ormai noto che gli acidi grassi n-3 esplicano le loro proprietà anti-aterogene, ipotensive e anti-dislipidemiche (McLennan et al., 1996), poi su malattie autoimmuni e addirittura neoplastiche. Numerosi sono gli studi che hanno evidenziato come, nel trattamento di importanti patologie autoimmuni (artrite reumatoide, colite ulcerosa e psoriasi o dermatiti atopiche), gli n-3, presentino un effetto antinfiammatorio e normalizzante (Lorenz et al., 1989; Hawthorne et al., 1992; Kremer et al., 1990; Grimminger et al., 1993; Bittiner et al., 1988; Harbige, 2003, Cleland et al., 2003). Altrettanto consistente è il numero di studi *in vivo* e *in vitro* che hanno messo in relazione le patologie cancerose e gli n-3 per i quali è stato testato l'effetto sulla proliferazione, il differenziamento, l'invasività e l'effetto metastasi in vari tipi di cellule tumorali (Kato et al., 2002; Li et al., 2001; Collet et al., 2001; Hawkins et al., 1998; Albino, 2000; Rose et al., 1996; Rose et al., 1997) .

Gli acidi grassi della serie n-3 rappresentano solo una piccola parte della vasta famiglia degli acidi grassi, essi appartengono alla classe degli acidi grassi essenziali (EFAs), che per definizione devono essere assunti dalla dieta, e sono compresi nella sottofamiglia degli acidi grassi poliinsaturi (PUFAs), composti da una catena acilica contenente un numero elevato di atomi di carbonio, alcuni dei quali impegnati in doppi legami che caratterizzano la classe costituendo le

insaturazioni. Alla stessa famiglia appartengono gli acidi grassi della serie n-6 che, insieme agli n-3, svolgono ruoli fisiologici strutturali e funzionali essenziali nell'organismo umano, contribuendo al normale sviluppo del sistema nervoso e alla funzionalità di quello cardio-vascolare. L'integrità, il normale sviluppo e la perfetta funzionalità dei sinaptosomi cerebrali, sia durante la fase fetale sia in quella neonatale o in età adulta, dipendono dalla concentrazione di n-6 e n-3 nel doppio strato fosfolipidico membranoso (Horrocks et al., 1999; Innis, 1994; Anderson, 1994). Una dieta ricca di n-3 limita lo sviluppo di depressione unipolare o qualora la malattia sia già presente, essa contribuisce a contenerne i sintomi (Hibbeln et al., 1995; Adams et al., 1996; Colin et al., 2003).

Bassi livelli di n-3 nel tessuto nervoso sono spesso associati allo sviluppo di malattie neurodegenerative, la malattia di Alzheimer, la schizofrenia, come l'arteriosclerosi e la demenza senile, sembrano essere patologie correlate positivamente con un'alimentazione ricca di grassi ed ad elevato contenuto calorico, mentre sono negativamente associate ad una dieta a base di pesce e ricca in n-3 (Grant, 1997; Fleischhacker, 2003; Morris et al., 2003; Alessandri et al., 2004; Yao et al., 2003; Zamaria, 2004; Young, 2005).

Ancora più consistente è il numero di studi che analizzano gli effetti degli acidi grassi n-3 in relazione al sistema cardiovascolare dove essi svolgono un'azione anti-dislipidemica, incrementando la "ratio" HDL (high-density lipoproteins)/LDL (low-density lipoproteins) e abbassando i livelli del colesterolo totale, diminuendo così i rischi di coronaropatie (Harris et al., 2003). Gli n-3 presentano inoltre una azione antitrombotica per la capacità di ridurre la concentrazione dei fattori di rischio quali: il trombossano A₂ (TXA₂), il fattore di attivazione piastrinica (PAF), il fibrinogeno, diminuendo così l'adesione, l'aggregazione piastrinica e potenziando la fibrinolisi (McCowen et al., 2005; Shahidi et al., 2004; Schmidt et al., 2005). La protezione del sistema cardiovascolare da parte degli n-3 si esplica anche a livello dei grandi vasi dove gli acidi grassi migliorano la regolazione del tono

vasale grazie alla riduzione della pressione arteriosa, sia diastolica sia sistolica, dovuta ad un'inibizione del rilascio di eicosanoidi ad azione vasocostrittrice, ad una aumentata sintesi di ossido nitrico (NO) con spiccate azioni vasodilatanti, e ad una ridotta viscosità ematica da associare ad una maggiore deformabilità delle membrane eritrocitarie, garantendo in questo modo una perfetta ossigenazione dei tessuti periferici. Una accertata azione antidislipidemica, anti-ipertensiva e antiaggregante degli n-3 si riflette negativamente sulla comparsa di placche aterosclerotiche, responsabili dell'indurimento ed ispessimento dei vasi sanguigni, con relativo rischio di trombosi e/o emorragia. Numerosi studi hanno evidenziato una minore tendenza all'aterogenesi in individui la cui dieta è basata su n-3, dove il numero di placche aterosclerotiche non solo tende a diminuire, ma il loro infiltrato è povero di macrofagi attivati e molecole di segnalazione pro-infiammatorie (citochine, chemochine, eicosanoidi, ROS), risultando così più stabili e meno propense ad indurre eventi cardiovascolari fatali (stroke, morte improvvisa, trombosi) (De Lorgeril et al., 2004; Hino et al., 2004).

La varietà di effetti benefici che gli n-3 apportano anche a livello di organi che non rappresentano propriamente il loro bersaglio elettivo è da imputare alla loro capacità di modulare la funzionalità del sistema immunitario che fa da sfondo alla regolare attività di tutti gli altri sistemi.

I primi studi dell'interazione tra n-3 e sistema immunitario risalgono al 1978 quando Meade e Martin evidenziarono l'effetto inibitorio degli n-3 sulla proliferazione linfocitaria *in vitro*. Il filone di ricerca venne subito seguito da numerosi gruppi di lavoro, i quali non solo confermarono quanto già stabilito da Meade ma dimostrarono anche che tali effetti erano specifici della famiglia n-3, dopo aver sperimentato e confrontato gli effetti degli acidi grassi n-3 con gli effetti pressoché nulli degli acidi grassi saturi o poliinsaturi della serie n-6. Gli studi *in vitro* fecero solo da prologo ad una grossa quantità di lavori che analizzarono gli effetti degli acidi grassi n-3 sul sistema immunitario *in vivo*,

prima su modelli animali ed in seguito su soggetti umani, sempre confrontati con la loro controparte n-6 .

Dagli studi *in vivo* svolti su cavie da laboratorio gli acidi grassi saturi e i poliinsaturi n-6 non presentano effetti sulla proliferazione linfocitaria (Yaqoob et al., 1994a, 1995a), produzione di citochine (Yaqoob & Calder, 1995a,b) o sull'attività delle cellule Natural Killer (NK) (Yaqoob et al., 1994b), opposti sono invece i risultati ottenuti dal trattamento con acidi grassi n-3, che sembrano inibire sia la proliferazione sia l'attivazione dei linfociti (Yaqoob et al., 1994a, 1995a; Jeffery et al., 1996; Jolly et al., 1997; Arrington et al., 2001) oltre che l'attività delle cellule NK (Yaqoob et al., 1994b; Jeffery et al., 1996). In aggiunta tali acidi grassi hanno dimostrato effetti inibitori sulla produzione di citochine pro-infiammatorie [TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α), IL-1 (Interleuchina-1)] e sull'espressione delle molecole di adesione [ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1 o CD54), v-CAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1 o CD 106), ELAM-1 (Endothelial Leucocyte Adhesion Molecule-1)] sia da parte dei linfociti che dei macrofagi attivati ed endotelio vascolare (Yaqoob & Calder, 1995b; Jolly et al., 1997, 1998; Wallace et al., 2001, Billiar et al., 1988; Renier et al., 1993; Yaqoob & Calder, 1995a; Wallace et al. 2000; Sanderson et al., 1995a).

Gli studi condotti su modelli umani concordano solo in parte con quanto è emerso dalle analisi su modelli murini, se Thies e collaboratori (2001a, b) hanno dimostrato l'inibizione di proliferazione linfocitaria e l'attivazione delle cellule NK in soggetti trattati con n-3, e Gallai (1993) o Caughey (1996) concordano con la capacità di tali acidi grassi di limitare la produzione di citochine pro-infiammatorie (TNF- α , IL-1, IL-6), molti altri studi hanno riscontrato un'assenza di effetti a seguito di trattamento con tali acidi grassi (Molvig et al., 1991; Cooper et al., 1993; Cannon et al., 1995; Schmidt et al., 1996; Blok et al., 1997; Yaqoob et al., 2000). Le incongruenze che risultano tra i vari lavori scientifici sembrano da imputare, non solo all'uso di diversi dosaggi degli acidi grassi, ma anche al diverso reclutamento dei soggetti in

studio da parte dei ricercatori, è emerso infatti che i soggetti più anziani hanno maggiore suscettibilità agli effetti degli n-3 rispetto a soggetti giovani o di mezza età (Meydani et al., 1991; Thies et al., 2001a,b).

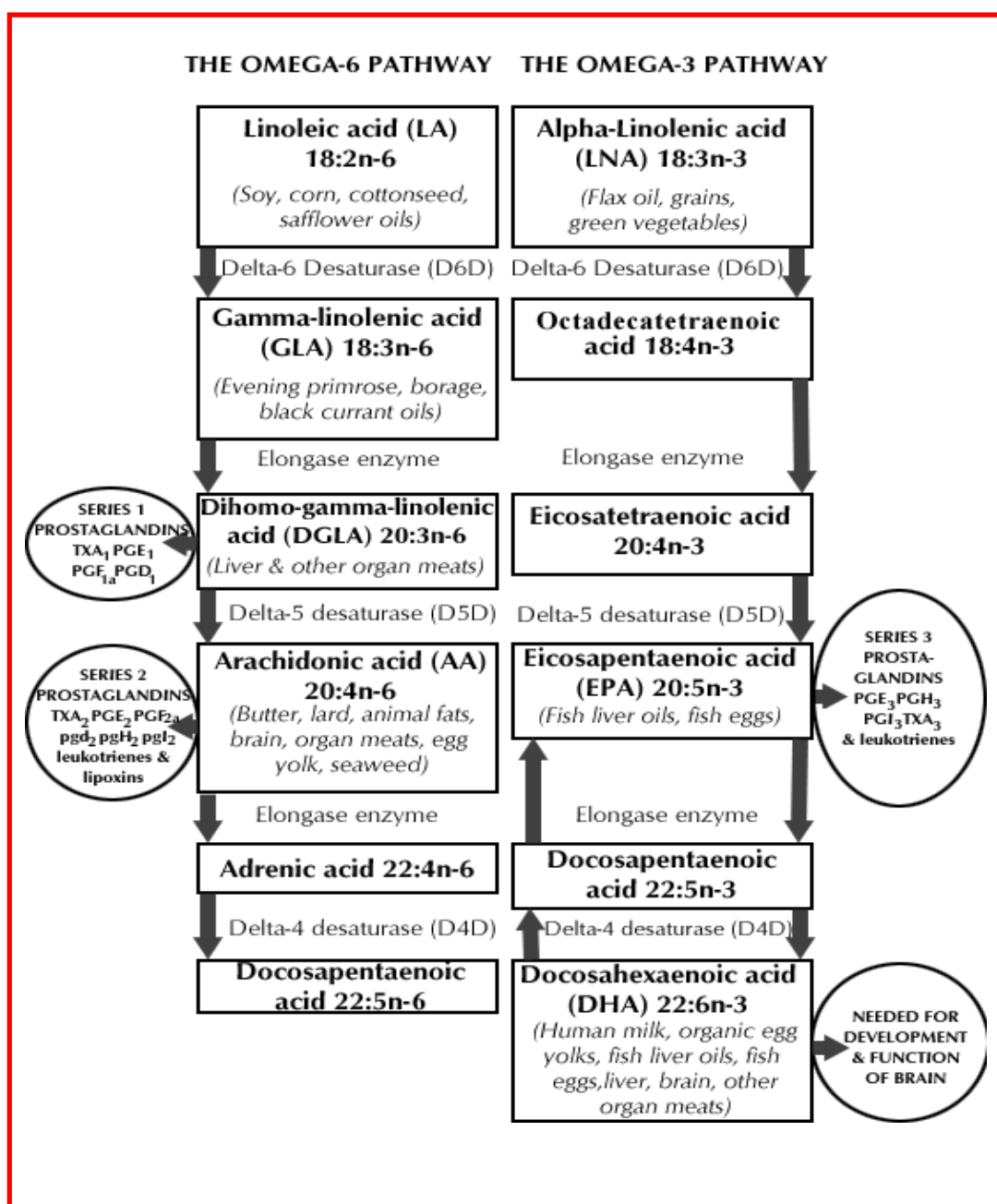
La classe n-3 trova il suo precursore nell'acido α -linolenico (α -LNA, C18:3; n-3), presente in alimenti di origine vegetale, che, una volta assunto con la dieta, viene metabolizzato da una serie di enzimi con attività di desaturasi ed elongasi fino a trasformarlo in diversi composti intermedi derivati tra cui i ben noti acidi eicosapentenoico (EPA, C20:5; n-3) e docosaesaenoico (DHA, C22:6; n-3), veri e propri responsabili degli effetti degli acidi della serie n-3. Sembra ormai più che affermata l'ipotesi che tutti gli effetti degli acidi grassi della serie n-3 finora illustrati siano da imputare proprio ai due acidi grassi derivati, con maggiore riferimento al secondo composto che nelle varie analisi è risultato sempre più attivo rispetto al primo. La famiglia degli acidi n-3 per struttura, composizione e funzione, è correlata agli acidi grassi poliinsaturi della serie n-6 di cui è precursore l'acido linoleico (LA, C18:2; n-6), anch'esso presente abbondantemente in alimenti di origine vegetale. Tale acido grasso, come precursore della serie n-6, condivide con l'acido linolenico (α -LNA), precursore della serie n-3, le vie metaboliche competendo con esso per gli enzimi desaturasi ed elongasi che mediano il metabolismo di entrambi. La competizione tra n-6 ed n-3 per gli enzimi metabolici comuni implica un'assunzione bilanciata dei due tipi di acidi grassi, così da evitare disequilibri nei metaboliti secondari che da essi derivano, è infatti proprio la diversa natura degli eicosanoidi prodotti dal metabolismo dei grassi n-3 ed n-6, che determina la diversità di funzione ed azione delle due famiglie di acidi grassi e regola il normale stato fisiologico dell'organismo. La natura degli eicosanoidi prodotti dalla famiglia n-6 può risultare talvolta contrapposta per attività e funzione ai prodotti della serie n-3. L'attività delle desaturasi ed elongasi nelle due famiglie di acidi grassi determinano la produzione di acidi grassi intermedi a loro volta utilizzati come substrati per la produzione di eicosanoidi, molecole

di segnalazione ad azione paracrina ed autocrina, da parte degli enzimi cicloossigenasi (COXs) e lipoossigenasi (LOXs). L'acido arachidonico (AA, C20:4; n-6), per la serie n-6, e gli acidi EPA e DHA per la serie n-3, sono trasformati in prostaglandine (PGs), trombossani (TXs) e leucotrieni (LTs) con diverse funzionalità. Tutti gli eicosanoidi derivati da AA, PGs della serie 2 e LTs della serie 4, presentano ad esempio una azione vasocostrittrice, pro-aggregante e pro-infiammatoria, mentre gli eicosanoidi derivati da DHA ed EPA, PGs della serie 3 e LTs della serie 5, presentano funzioni opposte.

Acidi Grassi Omega-3 e Omega-6

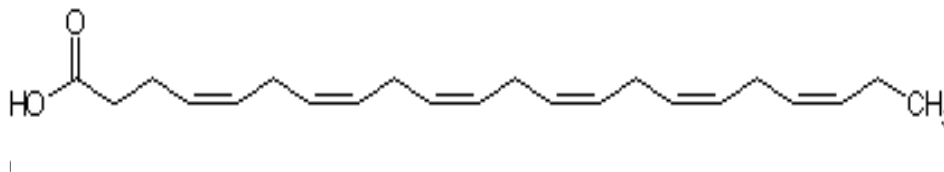
PUFAs	Nome	Acronimo	Struttura
Omega-3	Acido α -linolenico	LNA	18:3, n-3
	Acido eicosapentenoico	EPA	20:5, n-3
	Acido docosaesaenoico	DHA	22:6, n-3
Omega-6	Acid linoleico	LA	18:2, n-6
	Acido γ -linolenico	GLA	18:3, n-6
	Acido arachidonico	AA	20:4, n-6

Tabella dei principali acidi grassi PUFAs della serie n-3 e n-6



Quadro generale delle vie metaboliche per gli acidi delle famiglie n-3 e n-6.

1.3 Acido Docosaesaenoico (DHA, 22:6 n-3)



Il DHA è l'acido grasso con la catena acilica a maggior numero di carboni (C=22) e insaturazioni (6) presente comunemente nei sistemi biologici, rapidamente incorporato nei fosfolipidi delle membrane cellulari e mitocondriali (Zerouga et al., 1996; Stillwell et al., 1997; Tahin et al., 1981), sembra abbondare nei sinaptosomi, nei coni e bastoncelli della retina, dove rappresenta il 50% della totalità dei lipidi rispetto al 5% delle membrane cellulari che compongono altri tessuti (Salem et al., 1986). Il DHA si inserisce in membrana preferendo la posizione Sn-2 di fosfolipidi contenenti fosfatidiletanolamina (PE) e fosfatidilserina (PS) accumulandosi spesso nella porzione interna del doppio strato, a contatto con il citoplasma. Numerosi sono stati gli studi *in vitro* sulle possibili modifiche subite da membrane cellulari arricchite in DHA che sono però giunti a risultati spesso contraddittori e poco certi. La maggior parte dei lavori evidenziano la capacità del DHA di modulare le proprietà della membrana grazie a restrizione steriche dovute alla presenza di doppi legami, con relativa riduzione delle forze di Van der Waal's che mediano le interazioni intra- e inter-molecolari, comportando un decremento della stabilità di membrana, aumento degli spostamenti laterali e di "flip-flop" del doppio strato, rendendo la membrana più fluida e quindi meno selettivamente permeabile ad acqua e soluti. L'alterazione delle proprietà fisiche apportate dal DHA al livello della membrana sembra riflettersi sulla funzionalità delle proteine in essa inserite, il DHA può influenzare l'attività di

proteine trans-membrana, siano esse di trasporto o con funzione di canale, modificandone la conformazione (PKC, rodopsina).

Lo stesso colesterolo risente della presenza di DHA in membrana, esso diviene infatti meno solubile nel doppio strato e tende a spostarsi nelle zone della membrana più povere di insaturazioni in modo particolare verso lo strato lipidico esterno.

In relazione alla capacità del DHA di modificare le caratteristiche fisiche della membrana cellulare sono stati condotti degli studi sul suo possibile effetto anti-metastasi (Rose et al., 1996). La metastasi sopraggiunge come conseguenza di una serie di eventi biologici che comprendono lo spostamento e il distacco di cellule tumorali da un tumore primario, la loro mobilitazione attraverso l'organismo sfruttando i vasi linfatici e sanguigni, il passaggio e l'adesione nei nuovi organi bersaglio ed infine la crescita e la proliferazione per la formazione di nuovi foci tumorali. A tal proposito da uno studio di Zerouga et al., condotto nel 1997, è emerso che tanto maggiore è l'inserimento del DHA nello strato interno della membrana, tanto minore è la deformabilità di quello esterno, limitando in tal modo l'attraversamento delle pareti vasali di cellule tumorali che staccatesi dal tumore primario tentano di colonizzare altri tessuti bersaglio creando tumori secondari (Rose et al., 1996; Xia et al., 2005).

Nel 1998 Das e collaboratori (Das et al., 1998) evidenziarono che, in virtù delle modifiche a carico della membrana indotte dal DHA, le cellule tumorali risultavano meno resistenti ai trattamenti chemioterapici. La chemio-resistenza è una delle principali barriere per la cura contro il cancro, essa si manifesta attraverso una varietà di meccanismi, primo dei quali l'acquisizione da parte delle cellule della capacità di eliminare i chemioterapici attraverso la loro espulsione attiva. L'acquisizione di tale caratteristica impedisce al farmaco di raggiungere la concentrazione adatta per poter guidare verso la morte la cellula tumorale. Il meccanismo è noto come Multi-Drug Resistance (MDR). Il DHA *in vitro* è in grado di aumentare l'entrata del chemioterapico nella cellula e diminuire la sua eliminazione alterando la fluidità di membrana e quindi la

funzionalità dei canali proteici indicati come Multi-Drug Resistance Protein (MDR-P) implicati nell'espulsione del farmaco.

Lo studio del DHA in relazione alle malattie cancerose ha come oggetto il suo effetto preventivo, ma anche anti-proliferativo e pro-apoptotico che permetterebbe di utilizzare il DHA come adiuvante nelle terapie classiche chemioterapiche.

La maggior parte degli studi ecologici condotti dai primi anni '90 ad oggi evidenziano come l'incidenza di tumori in Giappone o nelle regioni ad elevato consumo di grassi di origine marina, ricchi quindi in n-3 ma soprattutto in DHA, è fortemente ridotta rispetto a popolazioni che non presentano un equilibrato apporto di n-3 nella dieta, supportando il ruolo protettivo di tali acidi grassi contro le neoplasie più comuni quali il carcinoma mammario, della prostata, dell'endometrio e del colon (Rose et al., 1999).

Le modalità con cui il DHA sia in grado di modulare la carcinogenesi, la crescita, la metastatizzazione di una neoplasia non è ancora nota, molte sono le teorie e le ipotesi formulate sulla base di un numero sempre più elevato di lavori scientifici oggetto dei quali è il DHA.

L'acquisizione di una massa tumorale solida e il numero esponenzialmente crescente di cellule che include, sono la conseguenza di un forte stress a livello cellulare dovuto a fattori sia interni (genetici) sia esterni (carcinogeni, mutageni), a cui fa seguito una potente attività mitogena e una ridotta capacità di attivazione della via di morte cellulare programmata (apoptosi) o la combinazione dei due eventi. Con molta probabilità il DHA è in grado di regolare ambedue i processi interferendo sia con la proliferazione cellulare sia sensibilizzando la cellula all'apoptosi; sebbene fino ad oggi molti studi abbiano analizzato nello specifico i diversi livelli che caratterizzano la modalità di azione di tale acido grasso su diversi tipi di tumori (biosintesi di eicosanoidi, perossidazione lipidica, traduzione del segnale, regolazione genica) non esiste ancora una visione generale e comprensiva delle vie attraverso cui il DHA manifesterebbe i suoi preziosi effetti.

Nel 2000 Chen e collaboratori (Chen et al., 2000) evidenziarono *in vitro* l'effetto pro-apoptotico e anti-proliferativo specifico del DHA, come risulta dalla comparazione con altri acidi grassi quali l'acido linoleico (LA, C18:2; n-6), l'acido arachidonico (AA, C20:4; n-6), l'acido linolenico (LNA, C18:3; n-3), nella linea di colon-carcinoma HT29. L'induzione alla morte cellulare programmata da parte del DHA, in tale lavoro, sembra associata alla sua capacità di ridurre l'espressione dell'onco-gene Bcl-2 con un conseguente decremento della relativa proteina anti-apoptotica Bcl-2 e mantenere contemporaneamente invariata tanto l'espressione quanto la traduzione della proteina pro-apoptotica Bax. Numerosi sono i lavori che concordano con quanto evidenziato da Chen (2000), supportando gli effetti pro-apoptotici del DHA manifesti soprattutto al livello delle proteine della famiglia Bcl-2 spesso ridotte nella loro porzione anti-apoptotica e incrementate nella loro controparte pro-apoptotica (Chiu et al., 2004; Calviello et al., 2005).

Altrettanto interessante è l'effetto anti-neoplastico del DHA che sembra particolarmente attivo nella regolazione della proliferazione e crescita della cellula tumorale intervenendo direttamente sul ciclo cellulare. La maggior parte delle cellule tumorali testate *in vitro* presentano infatti sensibilità al DHA, manifestando un blocco nell'avanzamento del ciclo cellulare a seguito di trattamento con diverse concentrazioni di acido grasso (Danbara et al., 2004; Siddiqui et al., 2003; Albino et al., 2000).

Come già accennato precedentemente, non esistono ancora dei dati certi che riescano a chiarire le possibili modalità con cui il DHA esplica i suoi effetti pro-apoptotici e anti-proliferativi al livello di malattie neoplastiche, ma si fanno sempre più consistenti almeno due ipotesi che vedono l'acido grasso protagonista di altrettanti processi cellulari in grado di regolare il differenziamento, la crescita nonché l'attivazione del programma di morte cellulare: (i) la modulazione dello stato redox cellulare e (ii) la regolazione genica attraverso l'attivazione di fattori di trascrizione specifici.

Stato redox cellulare

Per stato redox cellulare s'intende il rapporto di concentrazione intracellulare tra i composti di natura pro- e quelli anti-ossidanti. Tra i composti pro-ossidanti sono annoverate tutte le specie reattive dell'ossigeno (ROS), degli anti-ossidanti fanno parte invece tutte quelle molecole che hanno la funzione di tamponare la concentrazione e l'effetto dei primi.

Nell'ambiente intracellulare la presenza dei ROS è fisiologica e costante, essi infatti sono prodotti dal metabolismo aerobico mitocondriale, dall'attività degli enzimi con la funzione di ossidasi (xantina ossidasi, NADPH ossidasi, ammine ossidasi, mieoloperossidasi, lipoossigenasi, cicloossigenasi) e dal reticolo endoplasmatico attraverso l'attività del Citocromo P450 (Cyt P450). La produzione endogena dei ROS non è l'unica fonte di specie ossidanti, altrettanto costantemente infatti le cellule sono bersagliate dall'esterno da radiazioni ionizzanti, ultrasuoni, fumo di sigaretta, pesticidi ed inquinanti, composti ossidanti di diversa natura chimica, che contribuiscono ad incrementare il pool interno. I ROS includono radicali liberi come l'anione superossido ($O_2^{\cdot-}$), i radicali idrossilici ($\cdot OH$), i perossi-radicali ($ROO^{\cdot}$) e specie non radicaliche come il perossido d'idrogeno (H_2O_2). Denominatore comune di queste specie chimiche è l'elevata reattività, che si manifesta anche a concentrazioni bassissime (pmol/L), una limitata emivita, che varia da 10^{-12} secondi a poche ore e raramente giorni, ed infine la capacità di danneggiare le macromolecole cellulari quali acidi nucleici, proteine, ma soprattutto le membrane cellulari.

Mentre la scoperta dei ROS risale al 1775, grazie a Priestley che per primo osservò gli effetti tossici dell'ossigeno, l'analisi della possibilità che potessero svolgere ruoli di regolazione nei principali processi fisiologici e patologici nell'organismo umano è molto più recente, risale infatti agli anni '70, quando McCord e Fridovich (1969) isolarono per la prima volta l'enzima superossido

dismutasi (SOD) e Babior e collaboratori (1973) correlarono l'attività battericida dei neutrofili con la produzione del radicale superossido ($O_2^{\cdot-}$).

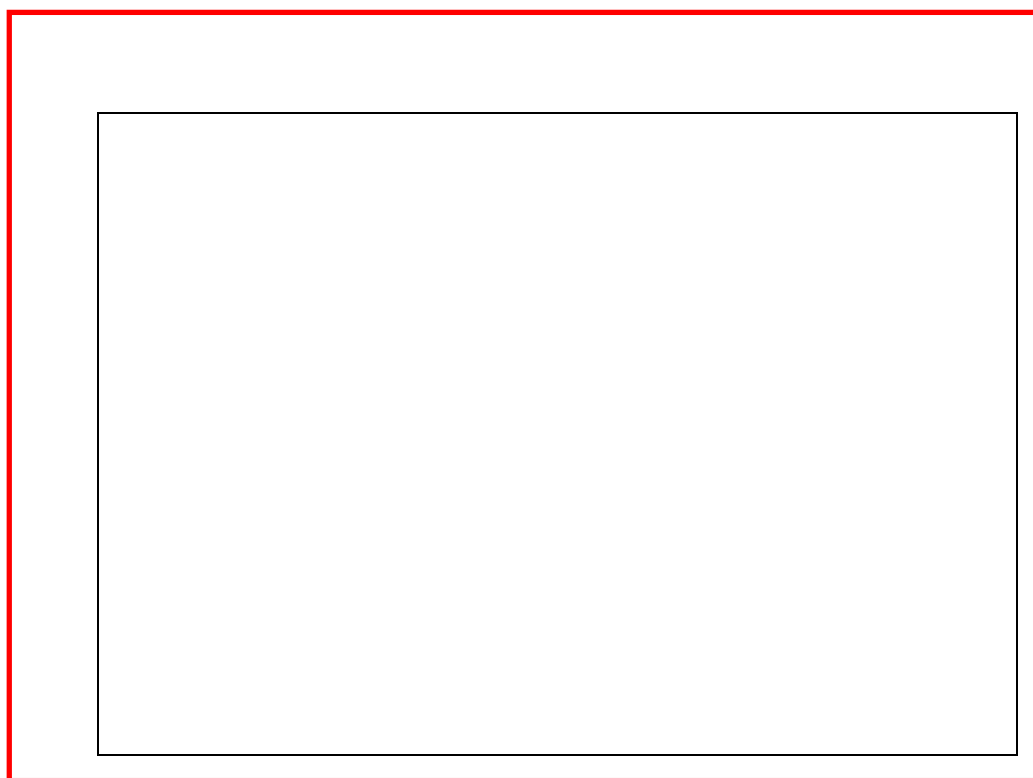
La pericolosità dei ROS è bilanciata dalla cellula attraverso il vasto spiegamento e la meticolosa attività di enzimi antiossidanti e scavengers deputati alla rimozione di tali composti. Del primo gruppo fanno parte gli enzimi specifici per il tipo di ROS presente nella cellula come catalasi (CAT), superossido dismutasi (SOD) e glutazione perossidasi selenio- e glutazione (GSH)-dipendente (GPx), che rispettivamente si occupano dell'eliminazione dell'anione superossido $O_2^{\cdot-}$, del perossido d'idrogeno (H_2O_2) e di tutti gli idroperossidi con particolare riferimento ai lipoperossidi di membrana.

Al secondo gruppo appartengono vitamine e composti antiossidanti ad attività generalizzata come α -tocoferolo (Vitamina E), β -carotene, acido ascorbico (Vitamina C), glutazione (GSH), selenio, deputati alla protezione dell'intero citoplasma e della membrana cellulare.

Finchè nella cellula la quantità di molecole pro-ossidanti è mantenuta sotto stretto controllo dagli scavengers e dagli enzimi antiossidanti, esse svolgono funzione di regolazione dei processi di crescita e differenziamento modulando l'azione delle proteine G, proteine tirosin-chinasi e tirosin-fosfatasi, proteine serin-treonina chinasi (PKC, MAPK), vie di segnalazione calcio-dipendenti, fattori trascrizionali quali AP-1 e NF- κ B e proteine che controllano checkpoints del ciclo cellulare (Rb, CDK), ma qualora la loro concentrazione superi quella dei composti antiossidanti si instaura un disequilibrio redox, conosciuto come stress ossidativo, con conseguente insorgenza di gravi patologie degenerative che includono la malattia di Huntington, il morbo di Parkinson, la sclerosi laterale amiotrofica, la malattia di Heltzheimer. Inoltre numerosi sono gli studi che evidenziano una stretta correlazione tra stress ossidativo e processi di carcinogenesi. Un così grande impatto al livello fisiologico dello stress ossidativo è da imputare alla capacità dei ROS di modificare tutti i macro-componenti cellulari includendo proteine, acidi nucleici e membrane lipidiche. Quando nella cellula si instaura un disequilibrio

redox tanto forte da permettere l'affermazione di uno stato di stress, le proteine, abbiano esse ruoli funzionali o strutturali, vengono modificate e rese pressoché inattive o attive erroneamente. Le porzioni proteiche che per prime risentono di un ambiente pro-ossidante sono quelle contenenti i gruppi tiolici, i quali ossidandosi, destabilizzano struttura e funzionalità della proteina, ne sono un esempio i canali del Ca^{2+} . Tali canali mutano la loro funzionalità e perdono la capacità di regolare l'entrata e l'uscita dello ione Ca^{2+} nel citoplasma, come conseguenza si ha un incremento della concentrazione intracellulare dello ione e l'attivazione di tutte le vie di segnalazione ad esso correlate. Ulteriore bersaglio dei ROS è il DNA che subisce mutazioni al livello di tutte e quattro le basi azotate e del deossiribosio lasciando che numerose mutazioni si accumulino sul doppio filamento. Uno dei più abbondanti prodotti di ossidazione che si presentano nel materiale genetico ossidato è 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deossiguanosina (8-oxo-dG) (Aust et al., 1999). Le relazioni che intercorrono tra la presenza di basi azotate ossidate e lo sviluppo di carcinogenesi non sono del tutto chiare, lo studio di Floyd (1990) ha comunque evidenziato un accumulo di 8-oxo-dG nei tessuti cancerosi e in quelli limitrofi. I lipidi del doppio strato membranoso sono anch'essi bersaglio dei ROS che attivano la reazione a catena di perossidazione responsabile della destabilizzazione strutturale e funzionale della membrana e delle lipoproteine in essa contenute con effetti deleteri sull'ambiente intracellulare. Durante la perossidazione lipidica il ROS più reattivo nei confronti dei lipidi, il gruppo idrossile $\text{OH}^\cdot$, si inserisce nel doppio strato attaccando le insaturazioni delle catene aciliche generando ulteriori radicali con la funzione di propagare la reazione che come termine ultimo produce idroperossi-lipidi (LOOH). Tali composti permangono nella membrana creando pericolose conseguenze: (i) il disturbo delle interazioni lipide/lipide e lipide/proteina; (ii) la produzione di ulteriori specie radicaliche che grazie alla loro forte instabilità chimica, possono generare modifiche secondarie ai costituenti del doppio strato attivando ulteriori reazioni a catena.

Una volta formati, i lipoperossidi, in dipendenza da una varietà di circostanze intracellulari, possono degradarsi o riarrangiare la loro struttura aumentando il loro effetto citotossico con la formazione di intermedi e prodotti altamente reattivi come le aldeidi quali malondialdeide (MDA), idrossinonenale (HNE) e i radicali alchilici che possono attaccare proteine e DNA minandone struttura e funzione.



Reazione a catena della perossidazione lipidica con formazione del prodotto MDA e HNE.

La perossidazione lipidica svolge un ruolo importante nell'attivazione dei processi apoptotici, la stretta relazione tra morte cellulare programmata e lipoperossidi non è ancora del tutto chiara, ma si ha la certezza che essi svolgano un ruolo di spicco nell'attivazione del pathway apoptotico. Il livello di perossidazione e quindi il grado di stress subito dalla cellula fanno da elemento decisionale nella scelta del futuro cellulare: (i) l'assenza di fenomeni di perossidazione lipidica all'interno della cellula non dà situazione di stress

per cui la quantità di specie pro-ossidanti è esattamente bilanciata da quelle anti-ossidanti e come risultato si ottiene la sopravvivenza cellulare; (ii) una dose relativamente bassa di lipoperossidi può incrementare la risposta citoprotettiva da parte della cellula con aumento delle difese antiossidanti (GSH, α -tocoferolo, acido ascorbico, attivazione CAT, SOD, GPx) che fanno fronte allo stress assicurando vitalità cellulare; (iii) un danno ossidativo più esteso e quindi non perfettamente tamponato dalle barriere antiossidanti prevede un aumento dei lipoperossidi che, superando un certo ancora indefinito valore soglia, inducono la morte cellulare attraverso la via apoptotica; (iv) qualora il livello di danno ossidativo sia particolarmente elevato la cellula subisce passivamente la condizione di stress e muore per necrosi.



Rappresentazione schematica del coinvolgimento dei ROS e della perossidazione lipidica (LPO) sulla vitalità cellulare.

Con molta probabilità le capacità del DHA di regolare la crescita, il differenziamento e la morte cellulare programmata è associata alla possibilità

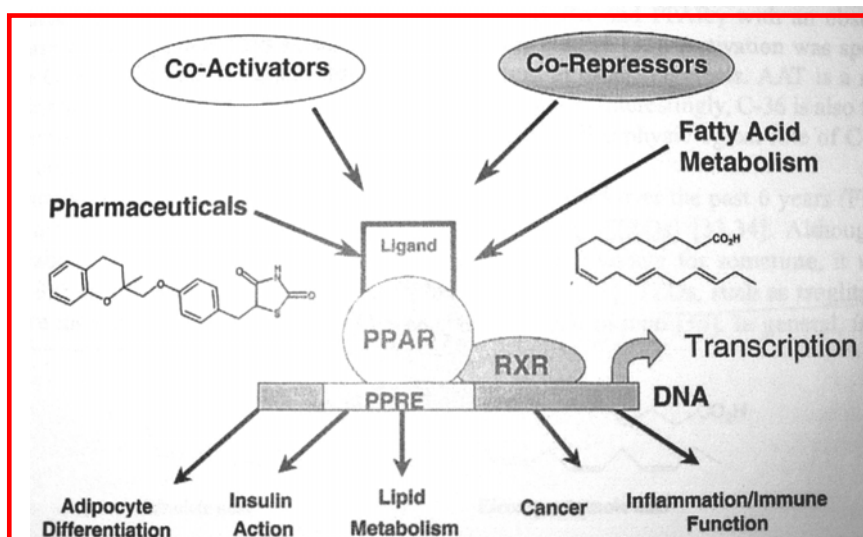
che, inserendosi nel doppio strato e disponendo di numerose insaturazioni, sia più facilmente sottoposto all'azione dei radicali liberi incrementando la produzione di lipoperossidi. Lo studio di Hawkins e collaboratori (1998) ha evidenziato che la reazione di perossidazione lipidica si genera molto più facilmente in una membrana ricca di insaturazioni dove il numero dei doppi legami e la lunghezza della catena carboniosa acilica dei lipidi sembrano più suscettibili all'ossidazione rendendo la cellula più sensibile al meccanismo di morte cellulare programmata.

La perossidazione lipidica oltre che mediata aspecificamente dai ROS intracellulari può essere il risultato di un meccanismo controllato e finemente regolato, ristretto ad alcuni compartimenti della membrana cellulare. Appare evidente a questo punto come la cellula abbia bisogno di un meccanismo versatile che possa essere facilmente modulato in tutti i suoi aspetti. Candidati a questo tipo di perossidazione sono gli enzimi lipoossigenasi (LOXs) e cicloossigenasi (COXs), facilmente modulabili trascrizionalmente e a livello traduzionale, essi si prestano a veloci quanto facili regolazioni. Ambedue gli enzimi catalizzano specifiche diossigenazioni degli acidi grassi di membrana e creano derivati idroperossidi con funzione di regolazione del meccanismo di morte e proliferazione cellulare.

Regolazione genica

Un'altra ipotesi di come il DHA possa effettuare il controllo sulla proliferazione, differenziamento, carcinogenesi, ed apoptosi nelle cellule tumorali è quella che lo vede protagonista della regolazione di geni implicati in tali processi attraverso l'attivazione di specifici recettori nucleari indicati come Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs). Appartenenti alla superfamiglia dei recettori per ormoni tiroidei/steroidi (TRs) e retinoidi (RXRs, RARs), essi regolano una grossa quantità di geni che intervengono nella regolazione dell'omeostasi lipidica, dell'adipogenesi, delle risposte

adattative alla fatica e allo stress, del controllo di risposte ormonali e infiammatorie, e sembrano implicati nella regolazione della carcinogenesi, del ciclo cellulare e nel controllo dei processi apoptotici. Sono conosciuti in 3 diverse isoforme ($-\alpha$, $-\beta/\delta$, $-\gamma$) con una diversa distribuzione tissutale ma strutturalmente correlate, caratterizzate da 5 domini, due dei quali impegnati nel riconoscimento di possibili proteine regolatorie ad effetto repressorio o attivatorio, un dominio variabile, una regione deputata al legame con il proprio ligando (Ligand Binding Domain, LBD), specifica quindi per l'isotipo, e un dominio, la cui struttura proteica è condivisa e mantenuta invariata in tutte le isoforme, deputato al legame con il DNA (DNA Binding Domain, DBD). All'interno del dominio DBD è contenuta la successione di aminoacidi deputata alla funzione di dimerizzazione con i recettori RXRs (D-Box), la sequenza, seppur variabile in base all'isotipo di PPARs analizzata, sembra essere altamente conservata. L'importanza e la conservazione del dominio DBD e del D-Box risiede nel fatto che esso è strettamente associato all'attività recettoriale dei PPARs. Il meccanismo più conosciuto attraverso cui i PPARs modulano l'espressione genica è, oltre il legame con il proprio ligando, l'eterodimerizzazione con i recettori retinoidi della classe RXR specifici per la forma all-trans (at-RA) o 9-cis dell'acido retinico (9-cis RA). Una volta formato, il complesso PPARs/ligando esso si completa legandosi a RXRs già fusi ai retinoidi, in questa forma il complesso PPARs/ligando-RXRs/retinoidi ormai completamente attivo, trasloca nel nucleo dove riconosce sequenze consenso (Peroxisome-Proliferator Response Elements, PPRE) specifiche normalmente presenti nei geni bersaglio (Lemberger et al., 1996).



Meccanismo generale di attivazione dei PPARs.

Dopo il legame con il proprio ligando, PPARs formano eterodimeri con i recettori RXRs e attivano la trascrizione di geni che presentano PPRE.

Sebbene la funzione della isoforma β , peraltro ubiquitariamente espressa, rimane ancora da definire, un più preciso quadro di attività è stato delineato per i PPAR- α e - γ che sembrano svolgere funzioni contrapposte ma complementari, nella regolazione dell'omeostasi energetica con particolare riferimento ai processi catabolici e anabolici di lipidi e carboidrati. PPAR- α regola l'omeostasi lipidica e l'ossidazione degli acidi grassi nei tessuti impegnati nel catabolismo di tali nutrienti come, fegato, muscoli e tessuto adiposo bruno, mentre la forma - γ è impegnata nell'anabolismo lipidico che prevede la sintesi, l'immagazzinamento e l'accumulo dei grassi negli adipociti. La loro diversa attività si rispecchia quindi nella diversa localizzazione tissutale, il primo maggiormente espresso nei tessuti con una funzione lipolitica il secondo in quelli ad attività lipogenica. Quando co-espressi, come nel caso del tessuto adiposo bruno, le due sottoclassi attivano geni target implicati preferenzialmente nell'uno o nell'altro processo in base alle esigenze metaboliche (Wahli, 2002).

La conoscenza della regolazione dell'omeostasi lipidica, sviluppata in modo particolare dal PPAR- α , è stata sfruttata contro le malattie dismetaboliche,

oggi tanto frequenti, che riguardano la porzione lipidica (ipertrigliceridemie, ipercolesterolemia). Ligandi particolari per PPAR- α detti fibrati hanno infatti la capacità di inibire la sintesi di trigliceridi endogeni, indurre la produzione di apolipoproteine della classe HDL (ApoA-I e ApoA-II), ridurre i livelli di colesterolo incrementando il catabolismo delle VLDL e limitandone la produzione.

L'isoforma PPAR- γ è nota, oltre che per la regolazione del metabolismo lipidico, anche per il controllo dell'omeostasi del glucosio, processi peraltro strettamente correlati. In tal senso è già da tempo diffuso l'uso di agonisti di PPAR- γ come cura contro il diabete. I tiazolidinedioni (TZDs, troglitazone, rosiglitazone e pioglitazone) sono composti identificati come ligandi per PPAR- γ e costituiscono una nuova classe di farmaci antidiabetici utilizzati come agenti terapeutici ipoglicemizzanti nella cura del diabete di tipo 2. La funzione dei PPAR- γ attivati dal ligando è quella di diminuire l'insulino-resistenza, caratteristica di questa patologia incrementando la sensibilità periferica all'insulina attraverso la regolazione di geni i cui trascritti sono interessati alla mobilitazione, la produzione, l'assorbimento e l'utilizzazione del glucosio (Vazquez et al., 2002).

La presenza e l'attività dei recettori nucleari PPARs non è limitata ai tessuti con funzione lipolitica o adipogenica, ma essi sembrano espressi anche nelle cellule che compongono il sistema immunitario con particolare riferimento ai macrofagi, cellule dendritiche (DC) e linfociti siano essi B o T, dove regolano l'intensità, la durata, e le conseguenze relative allo stato infiammatorio di una risposta immunitaria innata o adattativa (Daynes and Jones, 2003). Tale regolazione è senza dubbio dovuta all'affinità di legame dei PPARs per gli eicosanoidi, primi responsabili dell'attivazione della risposta infiammatoria. Il legame tra leucotrieni o prostaglandine e PPARs, fornisce loro la capacità di regolare l'espressione di citochine proinfiammatorie (TNF, IL-6, IL1- β , IFN- γ) inibendone la produzione e il rilascio, molecole di adesione (V-CAM), proteine

trasmembrana costimolatorie (CD86, CD80), altri mediatori pro-infiammatori (NO, RANTES). I PPARs attivati infatti svolgono funzioni antinfiammatorie antagonizzando le vie di segnalazione innescate dai fattori trascrizionali NF- κ B e AP-1, primi regolatori dell'espressione di citochine pro-infiammatorie e molecole di adesione, inoltre sembra che i PPARs possano regolare la durata della risposta infiammatoria e/o la sua intensità inducendo l'espressione di geni che codificano per proteine responsabili del catabolismo dei mediatori pro-infiammatori (Cunard et al., 2002; Clark et al., 2000). Tale funzione anti-infiammatoria è largamente sfruttata in campo medico-farmaceutico con la sintesi di molecole ad attività di ligando-agonista di cui sono rappresentanti i farmaci appartenenti alla classe degli antinfiammatori non steroidei (NSAIDs, ibuprofene, indometacina, acido flufenamico e fenoprofene) che raggiungono i loro effetti se utilizzati a concentrazioni sostanzialmente più elevate rispetto ai ligandi naturali.

La relazione PPARs-cancro non è ancora del tutto chiara e si presenta controversa, alcuni lavori infatti propongono gli agonisti dei PPARs come forti induttori di carcinogenesi, mentre altri ne riportano l'effetto citoprotettivo nello sviluppo del tumore evidenziando la capacità di bloccare la crescita cellulare attraverso diversi meccanismi quali differenziamento e apoptosi.

In questo senso l'isoforma più studiata è il PPAR- γ che ha dimostrato effetti anti-proliferativi e pro-differenziamento sia *in vivo* che *in vitro* su una vasta gamma di tumori (tumore della vescica, del seno, del colon) (vedi Tabella Studi PPAR- γ sottostante), una volta attivato dal proprio ligando agonista (troglitazone, rosiglitazone, ciglitazone, 15-d-PGJ₂) (Avis, Martinez et al., 2005; Grommes et al., 2004).

Il controllo del processo di proliferazione, differenziamento, apoptosi da parte del PPAR- γ avviene attraverso la modulazione dei geni che codificano per proteine implicate nella regolazione dei check-points del ciclo cellulare (Rb, p53, p21, p27, cdk1, cdk4) e attraverso l'attivazione e/o repressione delle cascate di segnalazione regolate dagli enzimi chinasi (MAP- e JUN- chinasi).

Dallo studio *in vitro* di Shimada e collaboratori (2002) in una linea cellulare di colon-carcinoma (HT-29), è emerso che, i ligandi per PPAR- γ quali troglitazone e 15d-PGJ2 hanno inibito la sintesi di DNA bloccando le cellule nella fase G1 del ciclo, e hanno indotto apoptosi con una modalità dose-dipendente, inibendo l'espressione del gene c-myc e incrementando quella di c-jun. Gli stessi ligandi sono risultati pro-apoptotici *in vitro* su linee cellulari di cancro epatico inducendo l'attivazione di caspasi-3 (Toyoda et al., 2002), e gli stessi effetti sono stati osservati *in vitro* per linee cellulari di carcinoma polmonare (Tsubouchi et al., 2002).

Nel 1998 il lavoro di Elstner ha inoltre evidenziato la stretta relazione tra i PPARs e i recettori RXR notando che il solo trattamento con troglitazone di linee cellulari di cancro al seno (MCF-7) ha indotto un blocco proliferativo, il cotrattamento con l'acido retinoico 9-cis (9-cis RA) ha reso irreversibile il blocco e ha indotto apoptosi associata ad una forte diminuzione dei livelli di proteina anti-apoptotica Bcl-2. Lo stesso protocollo, applicato *in vivo*, ha rivelato i medesimi effetti pro-apoptotici su cellule cancerose mantenendo intatte le cellule normali non trasformate (Elstner et al., 1998, Yang et al., 2005).

L'effetto antineoplastico del PPAR- γ attivato da agenti agonisti è stato analizzato anche in relazione alla possibilità di modulare l'invasività di molti tumori, i risultati del lavoro di Panigrahy (2002) evidenziano la capacità del recettore nucleare di limitare o addirittura inibire l'angiogenesi e la neovascolarizzazione, caratteristiche essenziali per la proliferazione e lo sviluppo di una massa tumorale.

L'effetto antiproliferativo e pro-apoptotico del PPAR- γ , attivato dai propri agonisti (troglitazone, ciglitazone, d15-PGJ2), è stato testato *in vitro* anche su linee cellulari di adenocarcinoma pancreatico, giungendo alle medesime conclusioni ricavate dagli esperimenti condotti su altri tipi di tumore: (i) inibizione della crescita tumorale con relativo arresto cellulare in fase G1 del ciclo, (ii) aumento dell'espressione di CDK inibitori p21, p27, (iii) riduzione

della ciclina D1, (iv) induzione del programma apoptotico che si rivelato sensibile a inibitori pan-caspasi (Eibl et al., 2001; Elnemr et al., 2000; Motomura et al., 2000; Toyota et al., 2002; Itami et al., 2001).

Secondo un recente lavoro di Elnemr (2000) l'attivazione del PPAR- γ con i suoi agonisti, oltre che inibire la crescita delle linee cellulari di adenocarcinoma pancreatico ha indotto il loro differenziamento, evidenziato dall'incremento di espressione di proteine normalmente utilizzate come markers quali CEA (antigene carciembrionale), E-caderina e fosfatasi alcalina.

Cell line	Drug used	Effect
Prostate carcinoma		
LNCaP, DU145, PC3, human prostate carcinomas	Troglitazone, rosiglitazone, prostaglandin J ₂ , GW0233	Growth inhibition
PC3	Troglitazone, ciglitazone, rosiglitazone	Antiproliferative effect, cell-cycle arrest
Human thyroid carcinoma		
BHP 2-7, BHP 7-13, BHP 10-3, BHP 18-21	Troglitazone, rosiglitazone	Reduced cell number, induction of apoptosis
Gastric cancer		
MKN-7, MKN-28, MKN-45, AGS	Troglitazone, prostaglandin J ₂	Growth arrest
MKN-45	Troglitazone, pioglitazone, prostaglandin J ₂	Inhibition of cell growth, apoptosis
Colon carcinoma		
HT-29	Prostaglandin J ₂ , troglitazone	Cell-growth arrest, apoptosis
HT-29, CaCo-2, SW-480, DLD-1, LoVo, T-84	Troglitazone, pioglitazone, rosiglitazone	Growth arrest, differentiation
Moser, HCT116, 188, DLD1, DLD2, CX-1	Troglitazone, pioglitazone, rosiglitazone	Growth arrest, differentiation
C57BL/6J-ApcMin mice	Troglitazone	Increased polyposis
C57BL/6J-ApcMin mice (susceptible to intestine neoplasia)	Troglitazone, rosiglitazone	Increase in frequency and size of tumours
Phase II clinical trial for patients with chemotherapy-resistant metastatic colon cancer	Troglitazone	No tumour response
Human pancreatic cancer		
AsPC-1, BxPC-3, Capan-2, HPAF-II, MIA PaCa-2, PANC-1	Prostaglandin J ₂ , ciglitazone	Decreased cell number and viability
Capan-1, AsPC-1, BxPC-3, PANC-1, MIA PaCa-2	Thiazolidinedione class (unspecified)	Inhibition of growth, cell-cycle arrest in G1, differentiation
PK-1, PK-8, PK-9, MIA PaCa-2	Troglitazone	Cell-cycle arrest in G1, growth suppression
Human hepatocellular carcinoma		
PLC/PRF/5, Hep G2, HuH-7	Troglitazone	Apoptosis
HLF, HAK-1A, HAK-1B, HAK 5, and five resected tumours	Troglitazone	Growth arrest, cell-cycle arrest in G0/1
Hep G2, HuH-7, KYN-1, KYN-2	Troglitazone, rosiglitazone, prostaglandin J ₂	Growth arrest, cell-cycle arrest
Breast carcinoma		
Adenocarcinoma cells of the breast	Pioglitazone, troglitazone	Growth arrest and differentiation
MCF7	Troglitazone	Cell-cycle arrest in G1
MCF7, BT474, T47D, MDA-MB-231	Troglitazone	Growth arrest, apoptosis
Cultured cancer tissue from patients	Troglitazone	Growth arrest, apoptosis
MDA-MB-231, MCF7	Troglitazone	Growth arrest, cell-cycle arrest
MCF7, MCF7ADR	Phenylacetate	Growth arrest
Human lung cancer		
H157, H322, H520, H522, H1299, H1334, H1944, A549	Ciglitazone	Growth arrest, differentiation
H841, A549, PC14	Troglitazone	Growth arrest, apoptosis
Neuroblastoma		
LA-N-5, primary neuroblastoma cells	GW1929, phenylacetate	Growth inhibition, differentiation
NB-1	Troglitazone	Growth inhibition
Astrocytoma and glioma		
C6, U87, A172	LY-171.833, prostaglandin J ₂ , ciglitazone	Reduction of cell viability, apoptosis
T98G	Ciglitazone, prostaglandin J ₂	Apoptosis
BT4Cn	Tetradecylthioacetic acid, rosiglitazone	Growth inhibition
SK-MG-1	Troglitazone	Growth inhibition

Studi *in vitro* dell'effetto antineoplastico degli agonisti di PPAR- γ . (da Grommes et al., *Lancet Oncology* 2004; (5):419-429).

Il recettore nucleare PPAR- γ oltre ad avere affinità di legame per composti di sintesi come i TZDs, presenta specificità anche per molecole naturali, tra cui si annoverano gli acidi grassi poliinsaturi a catena lunga ed i loro metaboliti derivati del metabolismo ossidativo, gli eicosanoidi. Gli acidi grassi essenziali come l'acido γ -linolenico, l'acido arachidonico, il DHA ed EPA, ed i loro prodotti derivati dalle reazioni di ossidazione mediate dagli enzimi lipossigenasi (LOXs) come 9-HODE, 13-HODE, d15-PGJ2 sono considerati potenti ligandi agonisti ed attivatori endogeni di PPAR- γ (Willson et al., 2000; Forman et al., 1995).

Se per l' isoforma PPAR- γ sono note le funzioni antineoplastiche ci sono ancora molte incertezze su quale possa essere il ruolo di PPAR- α in tal senso, nel 1998 Roberts e collaboratori, da uno studio su cellule epatiche murine, hanno reso noto che l'espressione e l'induzione di PPAR- α preclude l'attivazione di meccanismi anti-apoptotici (Roberts et al., 1998), in contrasto un recente lavoro di Jiao e collaboratori su cellule tumorali epatiche umane evidenzia una funzione anti-neoplastica e pro-apoptotica per PPAR- α alla pari di PPAR- γ (Jiao et al., 2002).

LIGANDO	RECETTORE
Metaboliti di acidi grassi 8 (S)-HETE 8 (S)-HETE 8 (S)-HETE 8 (R)-HETE 8 (S)-HEPE PG15d-J ₂ LTB ₄ 15-HETE 9-HODE 13-HODE PGI ₂	Alpha beta gamma alpha alpha gamma Alpha Gamma Gamma/alfa Gamma/alfa beta
Acidi grassi Linoleic acid α -Linolenic acid χ -Linolenic acid Arachidonic cid Docosahexanoic acid Eicosapentaenoic acid Oleic acid	Alpha/beta/gamma alpha alpha alpha alpha/gamma alpha alpha
Ligandi sintetici TZDs (Ciglitazone, rosiglitazone, pioglitazone, troglitazone) FIBRATI (ciprofibrato, clofibrato)	Gamma alpha

Quadro generale dei principali ligandi per PPARs ed affinità per le varie isoforme.

1.4 Lipossigenasi (LOXs) e Ciclossigenasi (COXs)

Gli enzimi lipossigenasi, iniziando da un ancestrale gene precursore, non sono stati eliminati durante l'evoluzione ma piuttosto hanno subito la sua pressione continuando a differenziarsi fino a creare una famiglia enzimatica eterogenea ubiquitariamente presente nel regno vegetale (Casey et al., 1999; Grechkin, 1998) ed in quello animale (Brash et al., 1999; Kuhn et al., 1999). Dal 1974 (Hamberg et al., 1974), anno in cui fu scoperta la presenza di un isoforma di LOX nelle piastrine di sangue umano, la famiglia delle LOX dei mammiferi tende ad aumentare contando nuovi membri con funzioni differenti. Il ruolo delle LOXs è catalizzare la diossigenazione degli acidi grassi insaturi trasformandoli nei corrispondenti derivati idroperossidi conosciuti come acidi idrossieicosatetraenoici (HETEs), acidi idroperossieicisatetraenoici (HpETEs) e leucotrieni (LTs), più in generale detti eicosanoidi. La famiglia delle LOXs conta diverse isoforme distinte in base alla posizione della diossigenazione inserita sulla catena acilica dell'acido grasso e al tipo di metabolita secondario prodotto. Gli eicosanoidi derivati dalle diverse isoforme di LOXs sono stati studiati, sia *in vitro* sia *in vivo*, per testare la loro influenza sui processi di carcinogenesi e proliferazione delle cellule tumorali, si è arrivati così a distinguere differenti sottoclassi di LOXs per cui è stato possibile delineare una diversa capacità di inibire o indurre le trasformazioni cancerose. Gli enzimi lipossigenasi -12, -5, e -8 (12-LOX, 5-LOX, 8-LOX) ed i metaboliti da essi derivati hanno dimostrato di contribuire sostanzialmente alla carcinogenesi. Tutti gli enzimi suddetti, poco espressi in normali condizioni fisiologiche, vengono trascritti e tradotti con maggiore frequenza dalla cellula durante le fasi iniziali della carcinogenesi con un conseguente aumento della loro attività e relativo accumulo dei loro prodotti, i quali manifestano la capacità di interferire con l'attivazione del programma di morte cellulare programmata a favore di una induzione di proliferazione e sviluppo di sistemi di resistenza. Le conoscenze più specifiche si hanno per l'enzima 12-LOX, i cui livelli di

espressione e relativa presenza proteica, sembrano associati al grado di invasività che il tumore acquisisce e allo stadio che esso ha raggiunto. Il prodotto della 12-LOX, 12-S-HETE, è in grado di regolare i processi di invasione e metastasi delle cellule cancerose attraverso l'incremento di espressione delle molecole di adesione, del contatto delle cellule tumorali con la matrice di fibronectina tissutale, stimolando anche l'angiogenesi e la migrazione delle cellule tumorali. A sostegno di tali affermazioni esistono numerosi studi sia *in vitro* sia *in vivo* che evidenziano quanto il silenziamento del gene 12-LOX attraverso mRNA-antisense sia in grado di ridurre la massa tumorale e diminuirne l'invasività o l'effetto metastatizzante, inoltre analisi di comparazione *in vitro* tra cellule non metastatiche e cellule metastatiche, hanno notato che queste ultime presentano una maggiore espressione di 12-LOX e, come conseguenza, un forte incremento del prodotto 12-S-HETE. E' noto inoltre che inibitori specifici per 12-LOX (Baicaleina) bloccano la crescita tumorale e inducono la morte cellulare attraverso il meccanismo di morte cellulare programmata (Matsuyama et al., 2004; Yoshimura et al., 2004; Tong et al., 2002).

Per quello che riguarda invece lo studio degli effetti dell'enzima 5-LOX in relazione all'effetto sulla carcinogenesi e proliferazione tumorale, i risultati sono tutti concordi a definire una funzione induttiva dell'enzima non solo nello sviluppo, ma anche sulla proliferazione di cellule neoplastiche. L'enzima 5-LOX dipende per la sua attività catalitica da un cofattore proteico indicato come FLAP (Five Lipoxygenase-Activating Protein), con la funzione di presentare il substrato, l'acido arachidonico (AA), all'enzima che tramite diossigenazione si occuperà di trasformarlo in eicosanoidi (5-HETE, LTs della serie 4) ad azione pro- infiammatoria. L'utilizzo degli inibitori per FLAP ha reso evidente la funzione che tale lipossigenasi svolge all'interno di una cellula cancerosa: trattamenti *in vitro* con l'inibitore MK886, specifico appunto per FLAP, evidenziano un blocco della crescita di una grande quantità di cellule tumorali e l'induzione all'attivazione del programma apoptotico. Sembra

infatti che gli eicosanoidi derivati da 5-LOX, siano indispensabili alla cellula cancerosa per inibire l'attivazione del programma apoptotico e mantenersi in attiva proliferazione (Matsuyama et al., 2004; Avis et al., 2001; Matsuyama et al., 2005; Hoque et al., 2005). Non mancano però anche dati contrastanti secondo i quali gli inibitori di 5-LOX hanno indotto l'apoptosi in linee cellulari che non esprimevano né traducevano l'enzima, ne sono un esempio l'acido boswelico acetil-11- β o l'inibitore MK886 che inducono apoptosi rispettivamente in cellule tumorali monocitarie (HL-60) e linfomi pur mancando in tali linee cellulari l'espressione della 5-LOX (Hoernlein et al., 1999; Datta et al., 1999).

Comparata con le altre LOXs, sicuramente la 8-LOX ha ricevuto ben poche attenzioni dal mondo scientifico. Recenti lavori su cavie di laboratorio hanno evidenziato come l'attività di tale enzima aumenti la sua espressione durante i primi stadi della carcinogenesi, studi di mutagenesi *in vivo*, inoltre, evidenziano una forte induzione alla carcinogenesi qualora 8-LOX fosse over-espressa. Il suo prodotto 8-S-HETE è risultato potenzialmente genotossico tanto da contribuire allo sviluppo di un fenotipo mutageno in cellule normali (Burger et al., 1999; Muga et al., 2000). Anche se 8-LOX sembrava un enzima al solo appannaggio murino, un lavoro di Shureiqi (2000) e collaboratori attesta la presenza di tale proteina anche nell'uomo, ulteriori studi saranno svolti in questo senso per scoprire la sua funzione e il ruolo fisio-patologico nel modello umano.

Tra gli enzimi LOX, i dati più incerti in relazione alla loro attività sulla proliferazione e crescita tumorale, si hanno per gli isoenzimi 15-LOX-1 e 15-LOX-2 distinti per preferenza di substrato, il primo specifico per l'acido linoleico, il secondo per l'acido arachidonico. I prodotti di diossigenazione dell'acido linoleico da parte di 15-LOX-1 sono 15-S-HETE, 12-HETE e l'eicosanoide 13-S-HODE. Grazie a diverse sperimentazioni *in vitro* su vari tipi di linee cellulari tumorali, tutti i composti, sembrano dimostrare una forte capacità di indurre la morte cellulare programmata come conseguenza del

blocco del ciclo cellulare e dell'attivazione del recettore nucleare PPAR- γ (Kamitani et al., 1998; Hill et al., 1998; Shureiqi et al., 1999; Shureiqi et al., 2001). Per contro, è altrettanto consistente il numero di studi che evidenziano una proporzionalità diretta tra l'espressione di 15-LOX-1 e grado proliferativo del tumore tanto che l'inibizione di tale enzima in cellule di carcinoma prostatico PC3 ha inibito la crescita tumorale ed ha indotto la morte apoptotica (Kelavkar et al., 2001; Nie et al., 2001).

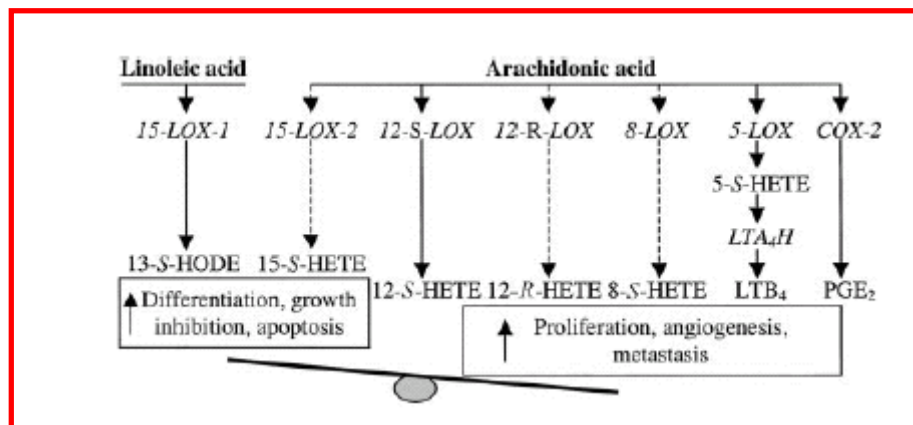
L'isoforma 15-LOX-2 è maggiormente espressa nei tessuti normali, mentre sembra ridotta in quelli tumorali dove la sua presenza è inversamente correlata al grado differenziativo del tumore. Come tutte le altre classi di LOXs, il suo substrato è rappresentato dall'acido arachidonico (AA) che, una volta ossidato, si trasforma nel composto derivato 15-S-HETE, sulla cui funzione non si è fatta ancora chiarezza. Alcuni dati suggeriscono per 15-S-HETE un effetto protettivo e anti-cancerogeno poichè sembra antagonizzare l'attività delle LOX-5 e -12, per cui è già abbastanza noto l'effetto induttivo sulla carcinogenesi (Vanderhoek et al., 1980; Vanderhoek et al., 1985). Gli effetti di 15-S-HETE sono dipendenti dall'induzione del programma apoptotico, attraverso PPAR- γ (Shappell et al., 2001), sebbene ci siano degli studi che evidenziano un effetto anti-apoptotico dell'eicosanoide (Sandstrom et al., 1995). Anche se il bilancio tra i risultati ottenuti sull'attività pro- o anti-apoptotica di 15-S-HETE dà maggiormente ragione a quest'ultimo effetto, tale ruolo richiede ulteriori conferme.

L'ultimo gene LOXs scoperto, prima nel topo poi nell'uomo, è ALOXE3 che codifica per l'enzima lipossigenasi LOX-3. Le informazioni di cui il mondo scientifico dispone riguardo a LOX-3 sono limitate, non si hanno dati esaurienti né sulla funzione fisiologica dell'enzima, né sull'attività, tantomeno sulla distribuzione tissutale e la sua espressione. La sequenza amminoacidica di tale enzima ha un elevato grado di similitudine con 12-LOX (54% di identità) e con 15-LOX-2 (51% di identità) con le quali sembra avere affinità. Numerosi studi hanno evidenziato come, pur avendo le sequenze

aminoacidiche che caratterizzano le LOXs (sito attivo contenete ferro e residui che definiscono la struttura), per LOX-3 rimanga ancora da definire la sua attività catalitica. Non è stata notata alcun tipo di attività enzimatica utilizzando i normali substrati caratteristici per il genere LOXs quali acido arachidonico e acido linoleico (Kinzig et al., 1999). Anche la sua distribuzione tissutale sembra limitata agli epiteli cheratinizzati come la pelle, dove la sua espressione è associata a stati patologici gravi di ipercheratosi e disfunzioni epidermiche, sempre in concomitante presenza di LOX-12 (Krieg et al., 2001). La scoperta delle mutazioni di espressione di LOX-3 e LOX-12 nello stesso tessuto, soprattutto in casi di patologia, ha portato i ricercatori a speculare sul possibile legame tra le due LOX scoprendo che LOX-3, anche se ha assunto oramai solo storicamente il nome di lipossigenasi, in realtà non svolge l'attività catalitica che caratterizza questa classe di enzimi ma è considerata una epossilcool sintasi con la funzione di metabolizzare ulteriormente i prodotti di 12-LOX (12-HPETE), e in minor misura delle due isoforme 15-LOXs, ad epossilcoli, meglio conosciuti come epossiline (Yu et al., 2003). Tali composti, oltre ad essere presenti in casi di patologia epidermica, sembrano intervenire anche nelle malattie neoplastiche. Gli studi di Li (2005) e Qiao (2003) hanno evidenziato un capacità anti-proliferativa e pro-apoptotica *in vivo* e *in vitro* delle epossiline, utilizzando come modello sperimentale cellule leucemiche e un composto di sintesi analogo delle epossiline (PBT-3, 10(S)-hydroxy-11,12-cyclopropyleicosa-5Z,8Z,14Z-trienoic acid methyl ester). Come gli enzimi LOXs anche gli enzimi COXs intervengono nell'ossidazione stereospecifica dell'acido arachidonico presente in membrana. Anche per COXs sono note diverse isoforme che producono diversi eicosanoidi: COX-1, è espresso costitutivamente in una ampia gamma di tessuti normali dove produce prostaglandine con una funzione fisiologica di segnalazione, e COX-2 la cui espressione è indotta in risposta ad una varietà di stimoli mitogeni come, citochine ed ormoni. Mentre l'espressione di COX-2 è limitata in tessuti normali, in quelli tumorali sembra incrementata sia durante le prime fasi di

sviluppo sia in quelle terminali di metastasi. La funzione di COX-2 e dei suoi eicosanoidi derivati (prostaglandine della serie 2 [PG-2] e trombossani della serie 4 [TX-4]) è probabilmente quella di indurre la proliferazione e far acquisire resistenza alle cellule cancerose. Numerosi studi *in vitro* su linee cellulari tumorali umane hanno evidenziato che mentre una up-regolazione di COX-2 promuove la proliferazione e l'angiogenesi la sua inibizione risulta anti-neoplastica (Romano et al., 2003).

La doppia funzionalità, pro- e anti-cancerogena finora illustrata, caratteristica degli enzimi LOXs, ma presente anche in COXs, suggerisce un equilibrio quantomai dinamico all'interno della cellula tra i relativi eicosanoidi da esse prodotti, il disturbo di tale equilibrio sfocia in uno stato di disordine generale che potrebbe essere implicato nelle fasi iniziali della tumorigenesi.



Equilibrio delle vie metaboliche mediate da LOXs e COXs sui substrati Acido Arachidonico e Acido Linoleico durante la tumorigenesi. Le frecce tratteggiate relative a 15-LOX-2, 8-LOX e 12-R-LOX riflettono il limitato numero di dati di cui si dispone per tali enzimi in riferimento alla carcinogenesi.

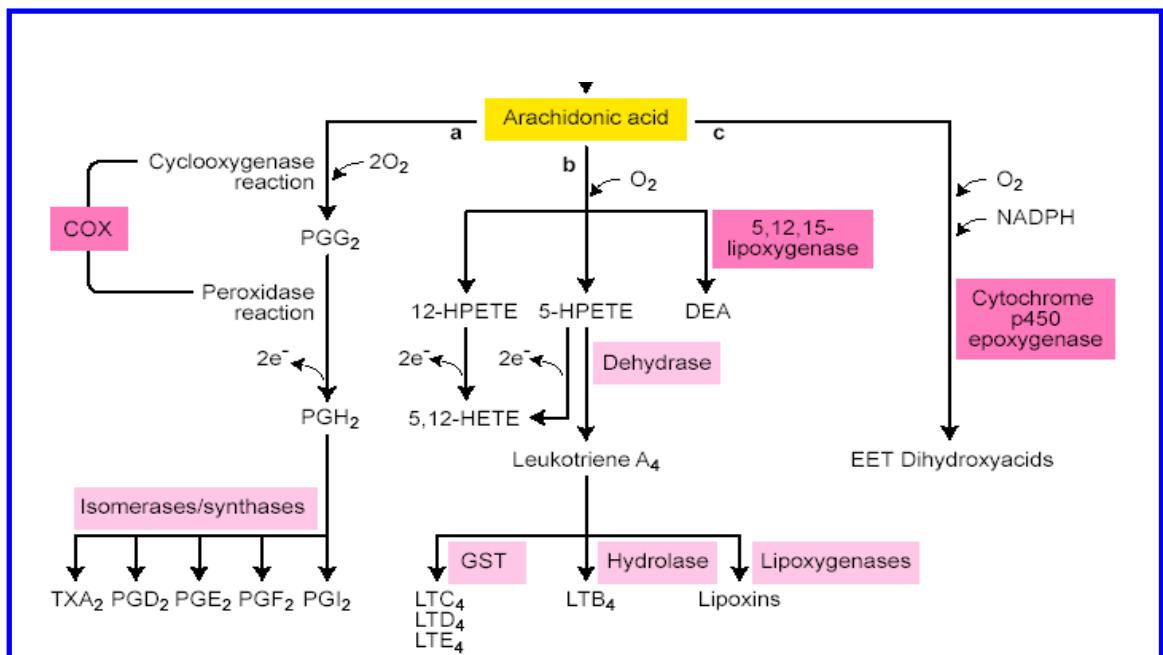
Il metabolismo ossidativo dei grassi non risulta al solo appannaggio degli enzimi COXs e LOXs ma è specifico anche di una superfamiglia di enzimi indicati come citocromi P450 (CYPs). Il ruolo di spicco che svolgono nel catabolismo del colesterolo, nella biosintesi degli ormoni steroidei, nel metabolismo e disattivazione di sostanze xenobiotiche come i contaminanti ambientali e i farmaci, è ormai conosciuto, mentre poco chiara risulta la loro

funzione fisiologica nella cellula. (Nelson et al., 1996). Le emoproteine CYPs sono espresse ubiquitariamente dagli organismi eucariotici, con una distribuzione tissutale variegata e una maggiore presenza nei tessuti epatici e renali. La loro localizzazione intracellulare è di preferenza correlata al reticolo endoplasmatico ma esistono sottoclassi che si inseriscono nella membrana interna del mitocondrio. La classe di CYPs che interviene nel metabolismo degli acidi grassi è indicata come epossigenasi ed ha la funzione di trasformare, mediante reazioni di ossidazione, il suo substrato, l'acido arachidonico, in derivati secondari conosciuti come acidi epossieicosatrienoici (EETs). Precedenti studi hanno dimostrato che tali acidi presentano attività di biomediatori e, alla stregua di PGs e LTs, svolgono funzioni fisiologiche diverse in base al tipo di regio-isomero considerato e alla cellula che lo produce. Per loro è stato possibile definire una linea generale di attività secondo la quale questi composti svolgono funzioni vasoattive ed antinfiammatorie. Così come non è chiaro il meccanismo biochimico innescato dagli EETs per la regolazione delle funzioni cellulari, non sono state ancora prese delle posizioni certe sul rapporto tra gli EETs e il programma di morte cellulare programmata. Lo studio di Chen e collaboratori (2001) ha documentato l'attività anti-apoptotica e citoprotettiva di uno degli EETs, 14,15-EET, in cellule epiteliali renali dove lo stimolo pro-apoptotico è stato indotto da H_2O_2 ed etoposide.

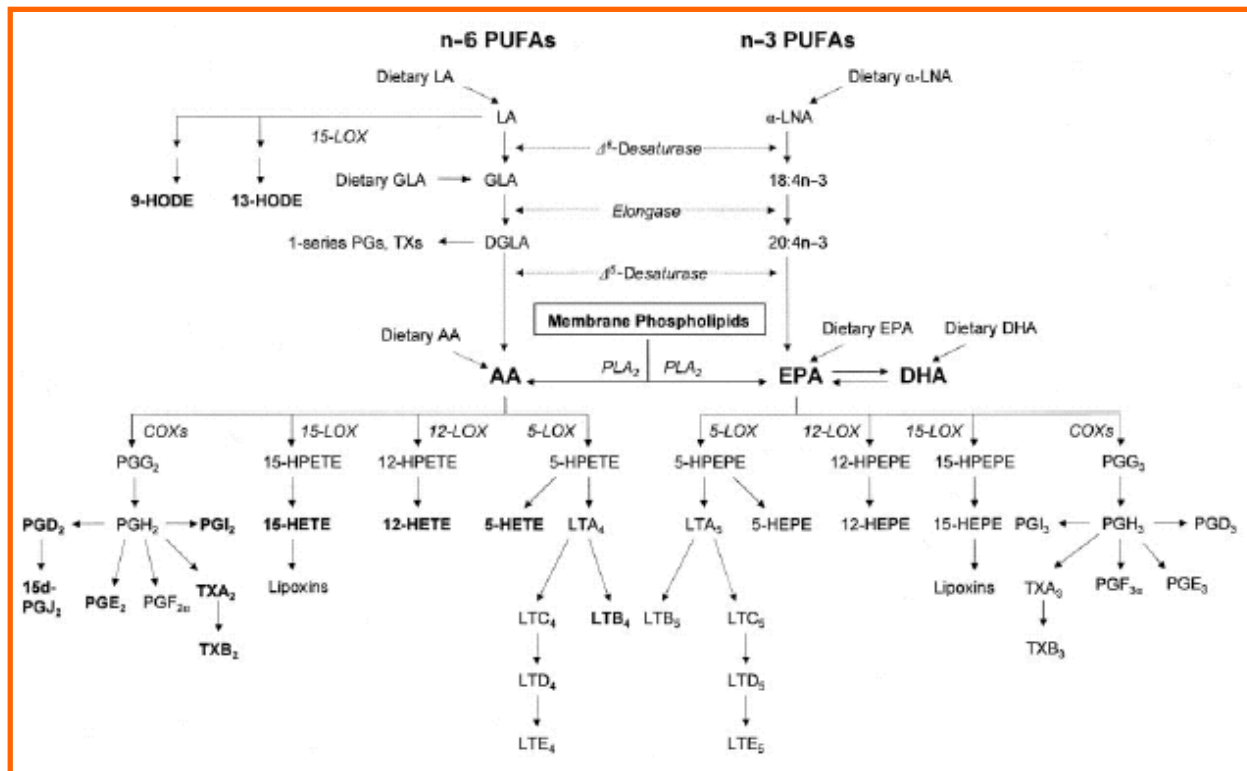
Di contrasto nel 2005 lo studio di Jiang (Jiang et al., 2005), evidenzia un effetto pro-carcinogeno di una isoforma del citocromo P450, CYP2J2, in grado di promuovere il fenotipo neoplastico inducendo la trasformazione e la proliferazione di cellule tumorali e fornendo loro resistenza all'attivazione di un programma apoptotico.

La capacità di regolare i meccanismi di proliferazione, differenziamento e morte cellulare da parte degli enzimi COXs, LOXs e CYPs epossigenasi risiede nel fatto che i composti prodotti dal loro metabolismo ossidativo sugli acidi grassi (PGs, LTs, HETEs, HpETEs, EETs) sono, per la maggior parte, dei

ligandi per i recettori nucleari PPARs, capaci di regolare i meccanismi vitali cellulari attraverso la modulazione dei geni che in tali processi sono coinvolti. Inoltre, poiché i substrati oggetto dell'attività ossidativa di LOXs, COXs e CYPs sono rappresentati dagli acidi grassi, ne consegue che il tipo e la concentrazione di acido grasso assunto dalla dieta influenza non solo la produzione, la concentrazione e la sottoclasse di composto secondario da esso derivati, ma anche, come già illustrato, la risposta cellulare.



Quadro generale del metabolismo ossidativo dell'acido arachidonico ad opera degli enzimi COXs, LOXs e CytP450.



Azione di LOXs e COXs sugli acidi grassi della serie n-3 ed n-6.

1.5 Adenocarcinoma pancreatico

L'adenocarcinoma pancreatico rappresenta ad oggi la quarta causa di morte nel mondo occidentale preceduto dal tumore del polmone, colon-retto, fegato e seno.

Conosciuto come uno dei tumori più letali tra le malattie neoplastiche umane a cause delle caratteristiche di asintomatologia o sintomatologia aspecifica, aggressività, e quindi estrema rapidità del decorso clinico, risulta essere resistente ai normali protocolli di trattamento chemioterapico (Evans et al., 1996; Buchler et al., 1991; Scheithauer et al., 1990). Ad aggravare il quadro, peraltro già difficile, è l'impossibilità di fornire una diagnosi precisa in fase iniziale del tumore a causa della localizzazione anatomica del pancreas e l'assenza di markers tumorali specifici per esso. Le statistiche che riguardano la sopravvivenza a seguito di un tumore al pancreas non sono confortanti, il rapporto morte/diagnosi è 0,99, l'aspettativa media di vita nelle forme già avanzate e metastatizzanti dell'adenocarcinoma pancreatico non arriva a 4 mesi con un tasso di mortalità del 97% (Devesa et al., 1995). A tutt'oggi l'unica terapia, peraltro efficace solo nel 10-15% dei casi, è la resezione chirurgica del pancreas previa assenza di metastasi secondarie e stretta localizzazione del tumore all'organo bersaglio (Lillemoe et al., 2000). Qualora non ci siano gli estremi per un intervento radicale di asportazione, si adottano trattamenti palliativi, tesi ad eliminare il dolore e migliorare la qualità di vita del paziente.

Le più moderne terapie di trattamento prevedono l'azione concomitante di radio e chemio-terapia combinata con gemcitabina e 5-fluorouracile (5-FU), ma anche in questi casi il guadagno in termini di sopravvivenza del malato è modesto e di poco superiore ai 5 mesi (Bakkevold et al., 1993).

La popolazione target è maggiormente rappresentata da individui di sesso maschile con un rapporto di insorgenza del tumore di 1.7:1 rispetto alla controparte femminile, con un range di età di comparsa molto ampio che varia tra i 35 i 70 anni, l'abuso di alcool e/o tabacco e casi di familiarità del tumore

sono ulteriori fattori predisponenti (Wingo et al., 1999; Boyle et al., 2005; Gudjonsson et al., 1987).

Fattori predisponenti all'adenocarcinoma pancreatico sono sia di natura ambientale sia nutrizionale oltre che puramente genetici, il fumo di sigaretta è una delle cause più comuni dello sviluppo di circa il 30% dei tumori pancreatici (Howe et al., 1992; Ghadirian et al., 1991; Lossing et al., 1986; Baghurst et al., 1991), una dieta non equilibrata, ricca di carni rosse e soprattutto di grassi, oltre che patologie gravi come diabete mellito (Ekoé et al., 1992; Gullo et al., 1994), pancreatiti croniche (Lowenfels et al., 1993; Balsan et al., 1995; Karlson et al., 1997) e familiarità della neoplasia, favoriscono l'insorgenza del tumore pancreatico (Ghadirian et al., 2003).

Da uno studio ecologico su 29 contee degli Stati Uniti condotto da Ghadirian e collaboratori nel 1991, è emerso che tra i fattori nutrizionali predisponenti all'adeno-carcinoma pancreatico compaiono: un elevato consumo di uova, latte e carne, mentre l'aumento nella dieta di verdure, frutta e fibre sono inversamente associate con il rischio di cancro pancreatico (Howe et al., 1992; Ghadirian et al., 1991; Ghadirian et al., 1995). Sebbene il ruolo svolto dall'alimentazione nella tumorigenesi del carcinoma pancreatico non sia ben delineato e risulti piuttosto generalizzato, si può comunque tentare di mantenere una dieta equilibrata e ricca di acidi grassi essenziali, le cui proprietà citoprotettive sono state ampiamente descritte, quantomeno per limitare l'insorgenza di tale patologia o, qualora sia già presente, contenerne l'accrescimento e l'effetto metastasi.

Dal punto di vista genetico non sono stati ancora localizzati locus genici specifici in stretta correlazione con la comparsa dell'adenocarcinoma pancreatico, seppure siano state evidenziate alterazioni geniche che riguardano soprattutto i geni onco-soppressori e onco-geni quali *K-ras*, *p16*, *HER2/Neu*, *MUC4*, *DPC4* e *BRCA2*, per i quali l'incidenza varia in base al grado di atipia (differenziato, indifferenziato, moderatamente differenziato) raggiunto dal tumore, sembra inoltre che tali mutazioni compaiano secondo un ordine

temporaneo definito durante l'avanzamento delle lesioni da pre- a post-neoplastiche (Parviz et al., 2003). La sequenza di mutazioni interessa prima i geni onco-geni e solamente in seguito gli onco-soppressori.

Mutazioni a carico dell'oncogene K-ras e HER2/Neu sembrano essere correlati agli eventi iniziali della progressione neoplastica, K-ras risulta iperattivato nella maggior parte degli adenocarcinomi (95%) (Hruban et al., 1993), così come HER2/Neu per il quale si nota un aumento di espressione nel tessuto tumorale in fase avanzata rispetto a quello normale (Day et al., 1996). Come accade per qualsiasi altro tipo di neoplasia anche nell'adenocarcinoma pancreatico si nota una deregolazione dei geni proto-oncogeni c-myc e c-fos che risultano ambedue over-espressi nella maggior parte dei casi (Schleger et al., 2002; Wakita et al., 1992).

Il gene CDKN2A, che codifica per la proteina inibitrice dell'avanzamento del ciclo cellulare p16, risulta inattivato nell'80% degli adenocarcinomi spiegando l'aggressività della neoplasia, mutazioni a carico di tale gene permettono infatti la duplicazione incontrollata delle cellule tumorali (Rozenblum et al., 1997)..

Solo durante la fase tardiva dello sviluppo della neoplasia si notano mutazioni che tendono a diminuire l'espressione dei geni onco-soppressori quali p53, BRCA2 e DPC4 (Smad4). Un decremento di espressione del gene p53 o la sua inattivazione nel 50-70% dei casi aggrava il quadro genetico accentuando il grado di instabilità ed eterogeneità delle mutazioni accumulabili durante le duplicazioni cellulari, rendendo ancora più aggressiva la patologia (Pantalone et al., 2004). Sebbene le mutazioni a carico del gene BRCA2, responsabile come p53 della stabilità genetica, siano più specifiche per il tumore al seno o all'ovaio, da recenti studi sembra che nel 17% dei casi di adenocarcinoma pancreatico si manifesti una diminuzione della sua espressione, soprattutto se il tumore presenta una storia familiare (Goggins et al., 2000).

Un altro gene la cui mutazione risulta relativamente specifica per il carcinoma pancreatico è l'onco-soppressore DPC4/SMAD4 (deleted in pancreatic adeno-

carcinoma) inattivato approssimativamente nel 50% dei casi di tumore pancreatico (Wilentz et al., 2000; Pantalone et al., 2004; Hua et al., 2003).

Della stessa classe dei geni onco-soppressori fa parte il gene DUSP6/MKP3 (dual specificity protein phosphatase 6/ Map kinase phosphatase 3), la cui espressione sembra soppressa già nelle prime fasi di trasformazione di cellule tumorali, il grado di inibizione del gene e della relativa proteina, infatti, sembra associabile al grado di differenziamento del tumore stesso (Xu et al., 2005; Cao et al., 2005).

Il gene MUC4 che codifica per la proteina mucina 4 è stato recentemente identificato come un marcatore caratteristico per l'adenocarcinoma pancreatico, secondo gli studi di Andrianifahanana (2001) e Swartz (2002), l'aumento di espressione di tale gene, non espresso in cellule pancreatiche normali, possa essere indice del grado di atipia raggiunto dal tumore.

Come per qualsiasi altro tipo di tumore, anche per il carcinoma del pancreas la scienza si sta muovendo alla ricerca dei meccanismi alla base del differenziamento e della trasformazione implicati nel processo di carcinogenesi, e sono sempre più studiati protocolli di trattamento che prevedono l'uso di vaccini anti-tumorali, terapia genica, vettori per agenti citotossici e markers genetici di popolazione, in modo da disporre di tecniche di indagine e terapeutiche sempre più accurate e specifiche per l'organo malato.

1.6 Apoptosi

Il termine “apoptosi” o morte cellulare programmata (dal greco αποπτωση, termine col quale si indica la caduta delle foglie dall’albero), venne coniato nel 1972 dal ricercatore John Kerr che per primo descrisse una serie di processi e cambi morfologici che caratterizzavano un nuovo tipo di morte cellulare, fisiologica e non accidentale, che si sviluppava secondo stadi controllati, termine ultimo dei quali è l’autodistruzione cellulare (Kerr et al., 1972).

L’apoptosi riveste l’importante ruolo biologico di regolazione nella maggior parte dei processi fisiologici coinvolgendo il differenziamento, l’omeostasi e la rimozione di cellule anormali in tutti i tessuti. Nell’uomo i processi di morte cellulare programmata sono basilari nel normale sviluppo embrionale (Meier et al., 2000) oltre che nella maturazione del sistema nervoso centrale (Naruse, 1995), nell’atrofia tissutale endocrino-dipendente (Kyprianou et al., 1988) e nel turnover cellulare di un tessuto (Wyllie et al., 1980; Lynch et al., 1986). Anche al livello del sistema immunitario l’apoptosi riveste un ruolo importante di regolazione: la selezione timica, l’eliminazione di cellule infettate da virus o cancerose e lo spegnimento delle risposte immunitarie (Cohen et al., 1992), sono esempi di indispensabilità d’intervento del processo apoptotico.

In questi termini è facile capire come una disfunzione o una deregolazione del programma di morte apoptotica possa essere la causa di un’ampia varietà di condizioni patologiche anche gravi che sfociano spesso in malattie cancerose o autoimmuni e patologie neurodegenerative o ischemiche.

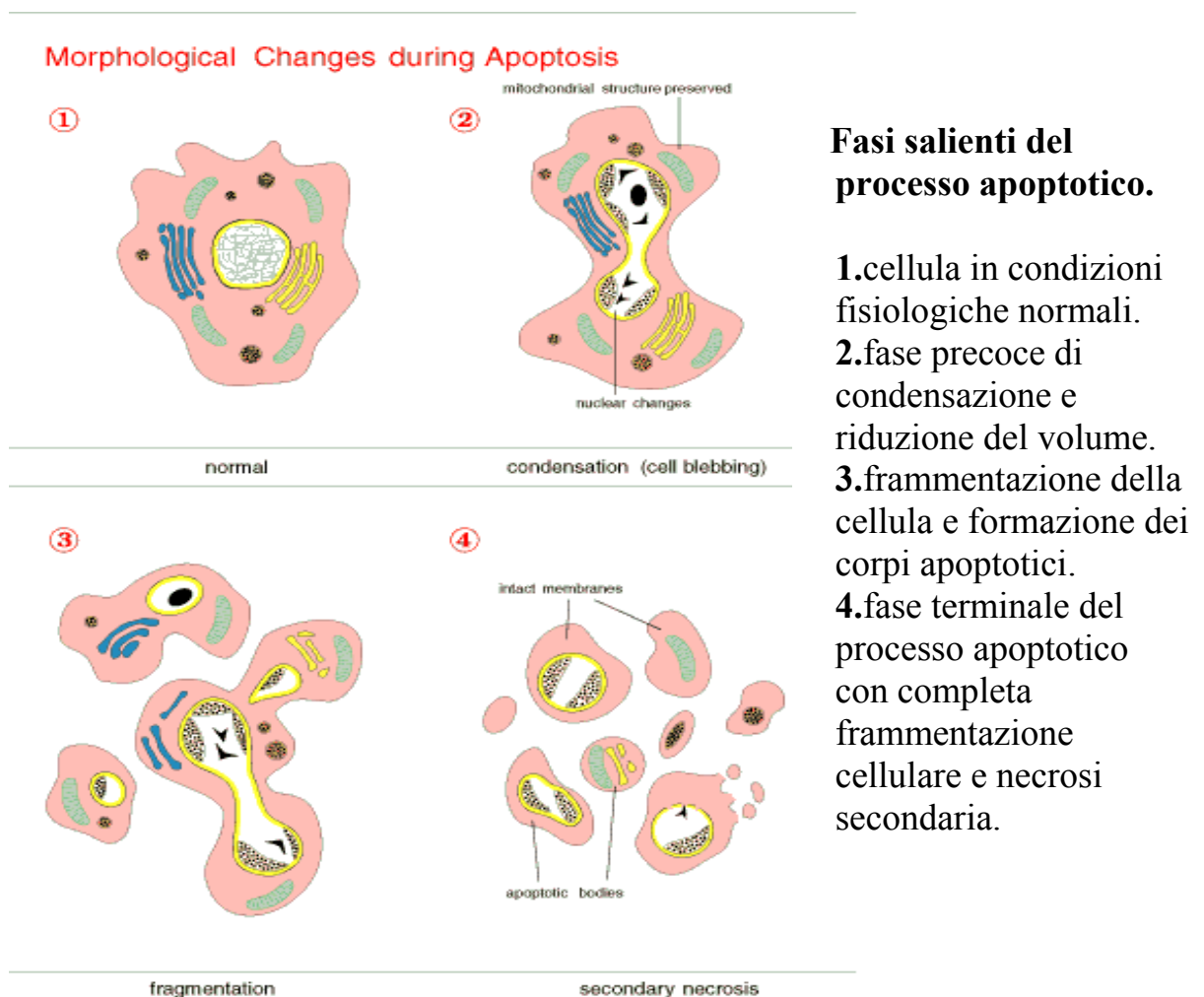
Dal punto di vista morfologico la cellula apoptotica segue una serie di stadi stereotipati come conseguenza di eventi biochimici e molecolari che in essa sopraggiungono. Durante le fasi precoci del processo apoptotico la cellula si condensa perdendo rapidamente volume, diminuisce i contatti con le cellule limitrofe e sostituisce le eventuali specializzazioni di membrana con catene proteiche, non espresse in condizioni normali, dette “molecole eat-me” con la

funzione di rendere più semplice il compito dei macrofagi, che per fagocitosi, provvedono all'eliminazione dei detriti cellulari alla fine del processo.

A livello nucleare si nota la disgregazione del nucleolo e la condensazione della cromatina, che verrà frammentata in porzioni discrete di 180-200 bp, lunghezza corrispondente ai tratti di DNA internucleosomale.

L'ultima fase del processo prevede la frammentazione dell'intera cellula in complessi membranosi contenenti citosol, cromatina condensata e organelli, indicati come corpi apoptotici, che verranno rapidamente rimossi dai macrofagi per evitare possibili risposte infiammatorie e processi flogistici secondari.

L'intero processo apoptotico interessa simultaneamente solo poche e singole cellule in un intero tessuto, e non dura che una o al massimo due ore, caratteristiche che ne rendono difficoltosa la localizzazione (Golstein et al., 1991; Majno et al., 1995).



Le modifiche morfologiche stereotipate che caratterizzano una cellula apoptotica sono modulate e sviluppate secondo dei meccanismi genetici e molecolari altrettanto conservati che prevedono la presenza cellulare di fattori geneticamente determinati pronti ad essere attivati, secondo un ordine ben definito, in risposta ad un segnale di morte. Le fasi salienti attraverso cui si sviluppa il programma apoptotico riguardano: l'induzione del processo, l'esecuzione e il riconoscimento/fagocitosi dei corpi apoptotici da parte dei macrofagi.

La fase di attivazione della morte cellulare programmata prevede diversi stimoli sia di origine endogena sia esogena in grado di innescare i percorsi biochimici che porteranno alla fase di esecuzione, stereotipata ed irreversibile, dell'apoptosi. Importante induttore endogeno di morte cellulare programmata è il prodotto del gene onco-soppressore p53, la proteina p53. Tale proteina è responsabile dell'arresto della crescita ed una eventuale riparazione o eliminazione di cellule nelle quali si sia manifestato un danno del materiale genetico. La proteina p53 lavora di concerto, nell'eliminazione di cellule anormali, con il prodotto di un altro onco-soppressore: la proteina pRb, primo regolatore nell'avanzamento di una cellula attraverso il ciclo cellulare. Mutazioni a carico di ambedue gli onco-soppressori contribuiscono alla comparsa di gravi patologie neoplastiche, ne sono un esempio la sindrome di Li-Fraumeni, causata da una mutazione autosomica dominante a carico del gene p-53, e il retinoblastoma infantile che è il risultato di una mutazione somatica del gene Rb.

L'assenza di fattori di crescita, indispensabili per la sopravvivenza cellulare, permette lo svolgersi di un programma endogeno di default che attiva l'apoptosi cellulare (Kerr et al., 1972), ne sono un esempio i linfociti T che in assenza di interleuchina 2 (IL-2), importante segnale mitogeno, attivano il programma di morte cellulare.

Un'altra importante causa di apoptosi è la riduzione di disponibilità di molecole di ATP. Pare infatti che esista un rapporto tra ADP ed ATP, pari a

1:5, che rappresenta un valore soglia al di sotto del quale la cellula attiva il programma suicida. Precisamente se il calo di ATP è massiccio la morte cellulare si manifesta sotto forma di necrosi, se risulta più moderato tutto si risolve per apoptosi (Leist et al., 1997).

Anche la regolazione di importanti messaggeri intracellulari, quali il calcio (Ca^{2+}) (Richter et al., 1991) e di enzimi regolatori quali la proteinchinasi C (PKC) (Bertrand et al., 1994) può, in modo ancora non del tutto chiaro, indurre apoptosi in un'ampia varietà di tipi cellulari. Un aumento dei flussi intracitoplasmatici di Ca^{2+} avviene molto precocemente, e può derivare sia dall'entrata di tale ione dall'ambiente extracellulare, che dal suo rilascio dai siti di sequestro intracellulari. Tale aumento sembrerebbe implicato nel processo di morte cellulare programmata a due livelli: quello di traduzione del segnale dove il Ca^{2+} potrebbe agire a monte di altri secondi messaggeri, convergenti poi sull'attivazione di una serie di proteinchinasi e/o fosfatasi in grado di regolare molecole effettrici del processo apoptotico; oppure quello si stimolare direttamente, in una fase più tardiva, l'attività di enzimi come proteasi ed endonucleasi, implicati nel meccanismo di morte cellulare.

Mentre, come sopra menzionato, tra gli induttori della fase di attivazione dell'apoptosi possono essere annoverati più fattori, per la fase di esecuzione del processo, la cellula prevede una serie di eventi stereotipati comuni o quasi, a tutte le vie d'innescio; la fase di esecuzione avviene attraverso una serie di reazioni enzimatiche a catena non più arrestabili ed automatiche, che portano la cellula inevitabilmente verso la morte cellulare. Protagonisti della fase di esecuzione sono gli enzimi caspasi, proteasi cisteina-dipendenti e aspartato-specifiche, la cui attività catalitica dipende dalla presenza nel sito attivo (QACRG), di un residuo di cisteina altamente conservato, e di un residuo di acido aspartico al livello del quale avviene il taglio proteolitico. Le caspasi sono disperse nel citosol cellulare in forma di procaspasi, zimogeni proteici inattivi, che subiscono il taglio proteolitico da parte di altre caspasi a monte secondo reazioni a catena, attivandosi in forma di eterotetramero.

Fine ultimo della cascata delle caspasi è disattivare tutti gli enzimi coinvolti nel mantenimento dei sistemi vitali cellulari quali riparazione e duplicazione del DNA, splicing dello RNA, conservazione della struttura citoscheletrica, per indurre a morte la cellula.

La famiglia delle caspasi nell'uomo raggruppa ben 14 membri, di cui solamente sette a tutt'oggi prendono attivamente parte al processo di morte cellulare.

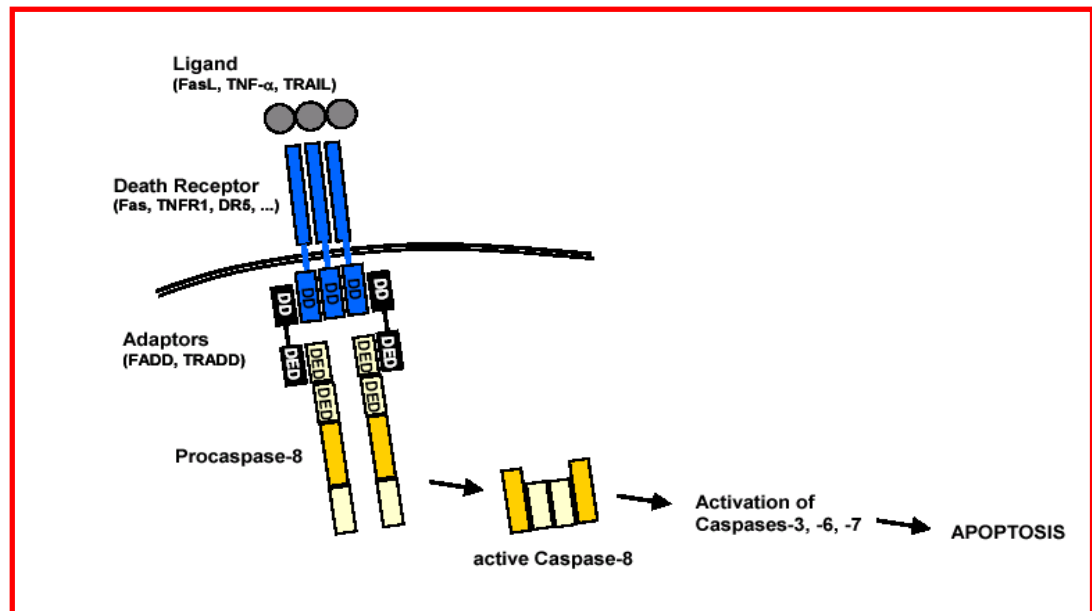
Le caspasi -1 , -4, -5, -11, -12 sembrano infatti essere coinvolte nel processo proteolitico di maturazione di citochine proinfiammatorie quali pro-IL-1 β e pro-IL-8 piuttosto che nel macchinario esecutivo apoptotico (Denault et al., 2002), mentre alle caspasi-3, -9, -8 e caspasi-2, -6, -7, -10 è stato riconosciuto il ruolo di protagoniste nello svolgimento del processo di morte cellulare. In particolare, le caspasi-3, -6 e -7, sono indicate come vere e proprie esecutrici del processo di morte, le caspasi restanti hanno funzione di “iniziatori”, una sorta di innesco segnale-specifico per diverse modalità di svolgimento della morte cellulare programmata.

La morte cellulare programmata prevede infatti due diverse vie di attivazione, (i) quella estrinseca o recettore-dipendente in cui il segnale di morte è fornito da oligomerizzazione del recettore di morte, espresso sulla superficie cellulare, attraverso il legame con il proprio ligando, e (ii) la morte indotta per via intrinseca, indipendente da recettori extracellulari ma strettamente correlata alla presenza nel citosol di molecole pro-apoptotiche altrimenti confinate e sequestrate in compartimenti cellulari. La prima via presenta la caspasi-8 come iniziatrice della fase di esecuzione del processo apoptotico, mentre la via intrinseca utilizza la caspasi-9.

Apoptosi per via estrinseca

L'apoptosi per via estrinseca è mediata dall'attivazione di recettori espressi sulla superficie cellulare, indicati come “death receptors”, che a seguito di legame con il proprio ligando trasmettono il segnale apoptotico e l'attivazione del programma di morte. Tali recettori appartengono alla superfamiglia dei recettori per TNF (Tumor Necrosis Factor) di cui fanno parte i recettori TNFR-1 (Tumor Necrosis Factor- α Receptor), CD-95 (Fas), e TRAIL-R (TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor) specifici per i loro ligandi, rispettivamente TNF, Fas-L, TRAIL. Tali recettori condividono caratteristiche comuni sia dal punto di vista strutturale che da quello funzionale, essi presentano un dominio extracellulare ricco in cisteina ad alta specificità per il proprio ligando che ne rende possibile l'attivazione tramite trimerizzazione, e un dominio citoplasmatico indicato come Death Domain (DD) indispensabile per il trasferimento del segnale dall'ambiente extra-cellulare all'interno della cellula. (Naismith et al., 1998; Nagata, 1996). Il DD, una volta ricevuto il segnale di trimerizzazione recettoriale, recluta molecole adattatrici intracellulari FADD (Fas-associated death domain) che tramite i loro Death Effector Domain (DED) sequestrano molecole di pro-caspasi-8 iniziatrici in prossimità della membrana per la formazione del DISC (Death Inducing Signalling Complex). Attraverso un processo di trans- e auto-proteolisi nel DISC, lo zimogeno pro-caspasi-8, viene trasformato in complesso attivo, caspasi-8, capace di processare a sua volta ulteriori caspasi effettrici (caspasi 3, 6, 7). La reazione a catena può culminare nell'attivazione diretta della caspasi 3, vera effettrice della via di morte poiché capace di inattivare e processare gli enzimi indispensabili alla vitalità cellulare (Apoptosi recettore-mediata di Tipo I), oppure nel processamento della proteina Bid, appartenente alla famiglia di Bcl-2, che integrandosi nel mitocondrio permette il rilascio dei fattori pro-apoptotici in esso contenuti (Apoptosi recettore-mediata di Tipo II) (Scaffidi et al., 1998).

La via estrinseca è normalmente utilizzata dal sistema immunitario per la selezione e la delezione timica della popolazione di linfociti T, lo spegnimento della risposta immunitaria evitando l'accumulo di linfociti reattivi, il mantenimento dello stato di immuno-privilegio per alcuni organi come occhi e testicoli, l'attività citotossica di linfociti CTL e cellule NK nei confronti di cellule infettate da virus o in tumorigenesi.



Apoptosi per via estrinseca. Dopo il legame con il proprio ligando (Fas-L, TNF- α , TRAIL) il recettore di morte (Fas, TNFR1, TRAIL-R) oligomerizza e recluta dal citosol molecole adattatrici e pro-caspasi-8 formando il DISC. Attraverso il taglio auto-proteolitico, la pro-caspasi si attiva processando le caspasi effettrici (caspasi-3, -6, -7) per la fase di esecuzione dell'apoptosi.

Apoptosi per via intrinseca

Nell'apoptosi che procede secondo il meccanismo intrinseco, il segnale di attivazione del processo può essere sia interno che esterno alla cellula. Deprivazione di fattori di crescita e sostanze nutritive, attivazione degli oncogeni, radiazioni UV, danni a carico del materiale genetico, stress di varia natura (stress ossidativo o indotto da agenti chemioterapici), sono solo alcuni esempi di fattori che minano la stabilità cellulare attivando il processo di morte cellulare programmata.

La via intrinseca si manifesta a seguito di una alterazione dello stato fisiologico dei mitocondri, organelli che non solo sono sede della respirazione cellulare ma rappresentano compartimenti di sequestro per vari fattori pro-apoptotici (Green et al., 1998; Kroemer et al., 2000; Bernardi et al., 1999; Loeffler et al., 2000). I segnali di morte endogeni hanno come bersaglio preferito il potenziale di membrana interna del mitocondrio ($\Delta\psi$). Tale potenziale viene destabilizzato dall'incremento della permeabilità di membrana (Permeability Transition, PT) che in maniera incontrollata permette il passaggio nell'organello di acqua citosolica e soluti fino al suo rigonfiamento e rottura della membrana esterna. Una volta distrutta l'integrità mitocondriale, segue il rilascio nell'ambiente extra-cellulare di fattori ad effetto pro-apoptotico come il citocromo c (Cyt c), AIF (Apoptosis-inducing Factor) (Susin et al., 1999), endonucleasi endoG (Li, 2001), Smac/Diablo (Verhagen, 2000). Il rilascio di tali fattori, l'incremento della permeabilità di membrana (PT), la dissipazione del potenziale di membrana del mitocondrio, sono causa di una diminuzione dell'omeostasi cellulare durante la quale la sintesi dell'ATP è sospesa e le molecole implicate nella regolazione dello stato redox generale sono ossidate (NADPH, NADH, GSH) con relativo aumento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Kroemer et al., 2000; Kroemer et al., 1997). Ne consegue una ossidazione aspecifica ed indiscriminata di lipidi, proteine e acidi nucleici (Marchetti et al., 1997). Sono molti i meccanismi che

sono stati proposti per spiegare PT, a tutt'oggi il riferimento maggiore è verso i cosiddetti Pori PT (PTP, Permeability Transition Pore), composti dalla fusione per interazione di un traslocatore di adenin nucleotide (ANT, Adenin Nucleotide Traslocator) e un canale per anioni voltaggio- dipendenti (VDAC, Voltage-dependent Anion Channel).

ANT è una proteina trans-membrana presente nella membrana mitocondriale interna, con funzione di canale antiporto, essa infatti è responsabile del trasferimento di ATP dal mitocondrio al citosol e contemporaneamente di ADP dal citosol al mitocondrio.

VDAC, anche chiamata porina, è presente invece sulla membrana esterna dove costituisce un poro non selettivo. Tramite interazioni proteina-proteina i due tipi di molecole trans-membrana formano complessi VDAC-ANT che mettono in contatto la membrana esterna con quella interna costituendo dei siti di connessione tra di esse (Beutner et al., 1998). Poiché la variazione di permeabilità PT della membrana è il fattore scatenante della morte cellulare mitocondrio-mediata, i pori PTP rappresentano per la vitalità cellulare un punto critico da mantenere sotto stretto controllo utilizzando dei raffinati meccanismi regolatori di cui sono protagoniste le proteine della famiglia Bcl-2 (Adams et al., 1998; Cory et al., 2002).

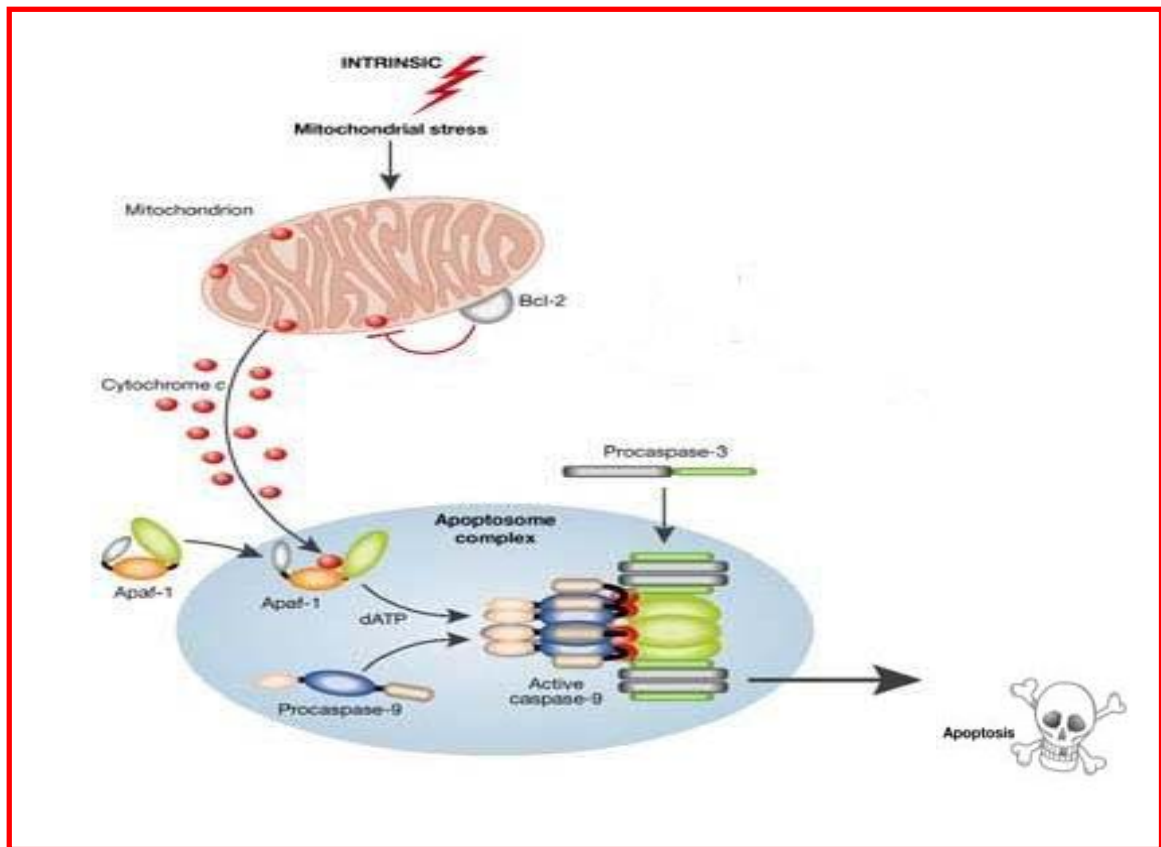
Con il termine Bcl-2 si definisce una famiglia di geni che codificano per proteine ad attività anti-apoptotica e pro-apoptotica, localizzate sia sulla membrana mitocondriale esterna, dove svolgono un'importante funzione regolatoria, sia sulla membrana nucleare e sul reticolo endoplasmatico. Nei mammiferi sono state codificate almeno 30 proteine appartenenti a questa classe, alcune delle quali manifestano attività pro-apoptotica come le proteine Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, A1, Mcl-1, altre invece rivestono il ruolo di induttori di morte come Bcl-X_s, Bax, Bak, Bok, Bid, Bim, Bik, Bad, Bmf, Hrk, Noxa, Puma, Blk, BNIP3 e Spike. Esse condividono uno o più motivi fortemente conservati detti Bcl-2 Homology Domains (BHs), conosciuti come BH1, BH2,

BH3, BH4, con la funzione di mediare l'interazione proteina/proteina per formare dimeri o oligomeri .

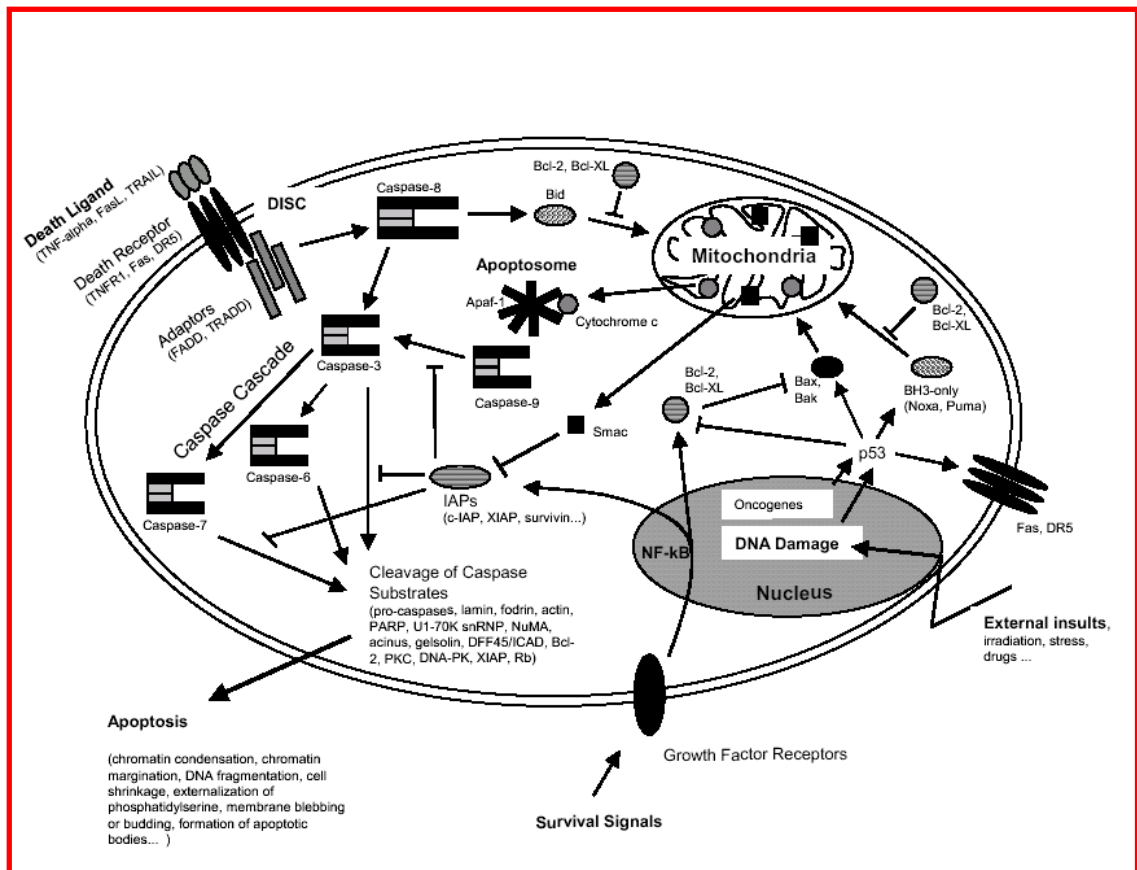
Dal momento della loro scoperta le proteine Bcl-2 hanno sollevato nel mondo scientifico non pochi dibattiti sul loro meccanismo d'azione nella regolazione del processo di morte cellulare programmata. Il primo modello fu quello che prevedeva un regolazione diretta da parte delle proteine Bcl-2 sull'attivazione della reazione a catena delle caspasi (Strasser et al., 2000), poi abbandonato a favore della seconda ipotesi di cui si è fatto portavoce Wang (Wang, 2001), il quale ipotizzava per le proteine Bcl-2 un ruolo centrale nella regolazione del processo apoptotico, ma solo in riferimento al mantenimento dell'integrità mitocondriale e al controllo del rilascio nel citosol di fattori pro-apoptotici in esso contenuti. Secondo la teoria di Wang, peraltro non del tutto accettata, la funzione di regolazione del processo apoptotico da parte delle proteine Bcl-2 risiede nella possibilità di tali proteine di sequestrare e rendere inattiva la controparte pro-apoptotica eterodimerizzando con essa. In questo modo il rapporto tra proteine inibitrici e attivatrici del programma di morte della famiglia Bcl-2 può determinare la propensione di una cellula a sopravvivere o a morire (Yang and Korsmeyer, 1996).

Membri pro-apoptotici	Membri anti-apoptotici
BAX	BCL-2
BAK	BCL-X _L
BAD	MCL-1
BCL-X _S	A1
BIK	BHRF-1
BID	

Poiché la principale funzione delle proteine Bcl-2 ad azione pro-apoptotica è quella di dimerizzare e modificare la permeabilità mitocondriale, formando pori attraverso la membrana (Antonsson et al., 2000), e destabilizzare l'integrità dei pori PT preesistenti legandosi ad uno dei suoi componenti VDAC (Tsujimoto et al., 2000), è chiaro come Bcl-2 e proteine anti-apoptotiche affini svolgano un ruolo regolatorio di spicco nell'attivazione del programma apoptotico intrinseco. Questa funzione di regolazione da parte di Bcl-2 è resa possibile grazie alla sua localizzazione a livello della membrana mitocondriale, la proteina sembra infatti legata ai complessi sopramolecolari (ANT/VDAC) che compongono i pori PTP. Qualora l'attività anti-apoptotica di Bcl-2 non fosse sufficiente a contenere la traslocazione e l'attivazione dei membri pro-apoptotici Bax e Bak, i pori che essi formano attraverso la membrana mitocondriale permettono il passaggio dal mitocondrio al citosol di fattori scatenanti la fase di esecuzione dell'apoptosi con l'attivazione della cascata delle caspasi, primo fra tutti il citocromo c (Cyto C). Il passaggio del Cyto C nel citoplasma e del fattore APAF-1 in presenza di ATP permette la produzione dell'apoptosoma, un complesso multiproteico citosolico che comprende molecole di procaspasi-9, caspasi iniziatrice nella via intrinseca mitocondrio-mediata (Salvesen et al., 2002b). Nell'apoptosoma, grazie all'attività proteolitica di APAF-1, la procaspasi-9 da zimogeno inattivo passa alla forma attiva (Denault et al., 2002) in grado di processare gli effettori procaspasi-3, -6, -7 che taglieranno ulteriori proteine substrato con l'effetto di ampliare il segnale di morte e avviare i cambiamenti morfologici e biochimici caratteristici di una cellula apoptotica.



Apoptosi per via intrinseca. I segnali di morte inducono il rilascio di fattori pro-apoptogeni dal mitocondrio come il Cyto C che, nel citosol, inducono la formazione dell'apoptosoma (Cyto C, Apaf-1 e ATP) e la processazione della pro-caspasi-9 a caspasi 9 attiva in grado così di attivare le caspasi effettrici a valle (Caspasi-3).



Rappresentazione schematica generale dei maggiori pathways apoptotici.
 L'apoptosi può essere indotta in risposta a diversi stimoli esterni o interni alla cellula, rispettivamente oligomerizzazione dei recettori di morte e stress intracellulari indotti da oncogeni, radiazioni o farmaci

1.7 Apoptosi e Cancro

Alterazioni nell'attivazione e nel normale avanzamento del pathways apoptotico sono coinvolte in una varietà di processi fisio-patologici che includono le malattie cancerose. Il controllo del meccanismo di morte cellulare programmata è modificato se non addirittura eliminato in cellule tumorali. E' già da tempo nota l'interconnessione tra proliferazione cellulare, regolazione del ciclo e apoptosi, tanto che una disregolazione del ciclo cellulare, peraltro inevitabilmente presente nelle cellule cancerose, può influenzare in maniera diretta la sensibilità della cellula agli stimoli pro-apoptotici. Da studi recenti è emerso che nella fase iniziale della progressione neoplastica, le cellule tumorali sono più sensibili agli agenti chemioterapici che inducono apoptosi, nelle fasi avanzate invece la cellula sviluppa resistenza. Questo può spiegare in parte la relativa sensibilità delle cellule tumorali di tumori primari a radio- e chemio-terapia comparata con le cellule provenienti da lesioni in stadio più avanzato o addirittura loro metastasi che hanno accumulato una quantità di mutazioni tali da sfuggire a qualsiasi tipo di controllo.

Le mutazioni geniche più frequenti nelle lesioni cancerose riguardano i geni onco-soppressori e la maggior parte dei geni che codificano per proteine che rivestono un ruolo chiave nell'attivazione e nel mantenimento del processo di morte cellulare programmata; ne sono esempi il gene p53 e l'oncogene anti-apoptotico Bcl-2 responsabili ambedue dell'attivazione e della regolazione del processo apoptotico.

Poiché la funzione di p53 è quella di mantenere invariato il patrimonio genetico, evitando la presenza di mutazioni o l'accumulo di esse, una sua diminuzione di espressione sembra coinvolta nelle fasi iniziali della tumorigenesi. In assenza del gene p53 funzionale la cellula mutata non è più capace di "guidarsi" verso l'apoptosi continuando a proliferare ed accumulando mutazioni che la trasformeranno in cancerosa. Da recenti studi è emerso che la maggior parte delle cellule tumorali non presenta il gene p53

attivo e la sua mancata espressione sembra responsabile della resistenza ai trattamenti di radio- e chemioterapia (Bold et al., 1997).

L'oncogene Bcl-2 che codifica per la proteina anti-apoptotica omonima, per sua natura, subisce, durante la tumorigenesi, una mutazione opposta a quella che caratterizza p53, esso infatti tende ad essere maggiormente espresso nella cellula tumorale che si rende così insensibile ai segnali di morte sia di natura intrinseca che di natura estrinseca. Altre mutazioni sono state segnalate a carico del gene pro-apoptotico Bax che sembra inibito in pazienti affetti da tumore particolarmente resistente alle terapie convenzionali.

Da recenti trends di studio, è emerso che la chemio- e radio-resistenza fortemente accentuata in adenocarcinoma pancreatico è il risultato di profonde modifiche nell'espressione dei geni che sembrano responsabili dell'attivazione, oltre che dell'avanzamento del processo apoptotico cellulare. Sembra infatti che tale neoplasia abbia, oltre ad una variata espressione di p53, una elevata espressione del gene anti-apoptotico Bcl-XL. Studi *in vitro* hanno dimostrato che utilizzando degli oligonucleotidi antisense contro mRNA di BCL-XL tali cellule sono risultate più sensibili all'apoptosi indotta da chemo- e radio-terapici.

E' ancora teorica ma in via di studio, inoltre, la possibilità di eliminare il tumore inducendo le sue cellule ad esprimere la proteina pro-apoptotica Bax. Studi *in vitro* evidenziano un incremento di sensibilità delle cellule verso gli agenti chemoterapici quali gemcitabina e 5-fluorouracile (5-FU). A sostegno della tesi sopraggiungono i dati in vivo di Schniewind (2004), secondo i quali un tumore pancreatico che esprime in maggiore quantità la proteina Bax impiantato in un topo SCID presenta una maggiore sensibilità all'apoptosi indotta dai chemoterapici, con conseguente regressione della massa tumorale.

Altre mutazioni a carico dei composti proteici che prendono parte al processo apoptotico, disattivato nei tumori, riguardano le proteine della famiglia IAPs (Inhibitors of Apoptosis), cIAP1, cIAP2, XIAP e survivina, che bloccano

l'apoptosi attraverso l'interazione con membri della famiglia delle caspasi funzionando da inibitori.

La funzione cellulare delle proteine della famiglia IAP non ancora totalmente chiarito, tali proteine sembrano coinvolte nella patogenesi di molte malattie neoplastiche come tumore del polmone, leucemia mieloide e cancro della prostata, purtroppo ancora poco si sa sul loro ruolo in adenocarcinoma pancreatico. Notizia certa è che elevati livelli di espressione di tali proteine coincidono con un grado di massima resistenza all'apoptosi da parte del tumore, in vitro sembra che in cellule di adenocarcinoma pancreatico l'overespressione di tali proteine conduce ad una resistenza al processo apoptotico indotto per via estrinseca Fas- o TRAIL- mediata.

L'indipendenza delle cellule tumorali dalla presenza dei fattori di crescita è una loro caratteristica che gli fornisce un vantaggio altamente selettivo rispetto alle cellule normali (Westphal and Kalthoff, 2003).

Dal momento che l'insorgenza e l'espansione clonale di un tumore preclude la mutazione di geni onco-soppressori ed oncogeni, e la relativa perdita di sensibilità delle cellule cancerose agli stimoli apoptotici fisiologici, la maggior parte della ricerca in termini oncologici si è spostata verso la comprensione dei meccanismi molecolari responsabili della resistenza all'apoptosi, alcune terapie infatti mirano a ristabilire la sensibilità cellulare agli stimoli di morte utilizzando terapia genica diretta specificatamente verso i membri del pathway apoptotico variati.

§ 2. SCOPO DEL LAVORO

In questi anni di dottorato, l'obiettivo della mia ricerca è stato quello di studiare gli effetti degli acidi grassi n-3, ed in modo particolare dell'acido docosaesaenoico (DHA; C22:6, n-3), nelle cellule tumorali umane. Seppur sia ormai certo l'effetto anti-proliferativo e pro-apototico di tali acidi grassi nella regolazione della crescita tumorale, non sono ancora noti i meccanismi attraverso cui la loro azione si manifesti. Le ipotesi più probabili sembrano associate ad una variazione dello stato redox cellulare o alla capacità degli n-3 di regolare geneticamente i processi cellulari tanto da indurre la cellula alla morte. Attualmente nessun lavoro scientifico descrive l'attività del DHA in adenocarcinoma pancreatico, che presenta, come caratteristiche principali, una forte resistenza alle terapie convenzionali di chemio- e radio-terapia ed un elevato grado di invasività.

Lo scopo e l'originalità di questo lavoro è stato, quindi, quello di investigare l'attività anti-proliferativa e pro-apoptotica del DHA *in vitro* su tale tumore e determinare quali fossero i meccanismi molecolari alla base degli effetti di tale acido grasso, utilizzando come modello sperimentale la linea cellulare Paca-44. A questo proposito si è voluto: (i) verificare la suscettibilità di tali cellule all'apoptosi DHA-indotta, (ii) studiare l'eventuale coinvolgimento di una variazione dello stato redox cellulare, e (iii) la possibile attivazione da parte dell'acido grasso di un meccanismo genetico che precludesse la relativa modulazione di geni implicati nel programma apoptotico.

Dopo aver verificato l'efficacia del DHA ad indurre il blocco proliferativo e l'apoptosi nella linea cellulare in esame, per verificare l'implicazione di un disequilibrio redox all'interno della cellula sono state analizzate le variazioni di tutti i parametri ad esso correlati (GSH, MDA, attività di GPx) dopo trattamento con l'acido grasso. Per investigare una possibile regolazione genica sono stati misurati i livelli di espressione di mRNA di geni implicati

nell'attivazione del programma apoptotico sia in condizioni basali che dopo trattamento con DHA. Si è considerata inoltre la possibilità che l'effetto pro-apoptotico del DHA si sviluppasse sfruttando un meccanismo genetico attraverso l'attivazione di recettori nucleari noti come PPARs, o attraverso la modulazione di geni implicati nel metabolismo ossidativo degli acidi grassi quali lipossigenasi (LOXs) e ciclossigenasi (COXs).

Supportato da futuri studi anche *in vivo*, tale lavoro potrebbe rivelarsi di grande utilità per affermare l'efficacia preventiva e soppressiva del DHA nei confronti dell'adenocarcinoma pancreatico, e proporre nuove strategie terapeutiche da adottare non solo nella cura di questo, ma anche di altri tumori.

§ 3. MATERIALI E METODI

Culture cellulari

La linea cellulare di adenocarcinoma pancreatico umano, Paca 44, utilizzata in questo studio è stata ottenuta dal Dr. M. V. Bulow (University of Mainz, Germania). Le cellule sono cresciute come monostrato in incubatore a 37°C, con atmosfera umidificata al 5% di CO₂, 95% di O₂ e coltivate in terreno di coltura RPMI supplementato con 10% di FBS (Foetal Bovine Serum), 2 mM L-glutamina, 100 IU/ml penicillina e 10 mg di streptomicina.

Reagenti e chimici

Il terreno di coltura RPMI 1640, soluzione tripsina 0.05%/ EDTA 0.02% in PBS, penicillina, streptomicina e FBS sono stati acquistati presso EUROCLONE.

L'acido docosaesaenoico (DHA) puro al 99% è stato acquistato presso SIGMA CHEMICAL (St. Louis Mo) e ricostituito in metanolo 99% alla concentrazione stock 0.05 M, conservato a -80°C, diluito poi in RPMI 1640 alle concentrazioni richieste.

L'acido ascorbico (Vitamina C), α -tocoferolo acetato (Vitamina E), butilato idrossitoluene (BHT) sono forniti da SIGMA CHEMICAL (St. Louis Mo) ricostituiti il giorno stesso dell'esperimento rispettivamente in acqua distillata sterile, etanolo 99% e metanolo 99%.

Gli inibitori dei canali per GSH, cistationina e metionina, sono stati acquistati presso la stessa ditta e ricostituiti rispettivamente in HCl 1M alla concentrazione 1M, e in acqua distillata sterile alla concentrazione stock 0.1 M, conservati a 4°C e diluiti in RPMI alle concentrazioni richieste.

Il glutatione (GSH) ed il suo precursore N-acetilcisteina (NAC) sono stati acquistati presso SIGMA CHEMICAL (St. Louis Mo) e ricostituiti in RPMI 1640 alla concentrazione richiesta lo stesso giorno dell'esperimento.

Il sodio selenato (Na_2SeO_4) è stato acquistato presso SIGMA CHEMICAL (St. Louis Mo) e ricostituito in acqua distillata sterile, alla concentrazione stock di 100 mM e conservato per breve tempo a 4°C.

La vitamina A come acido retinoico all-trans (at-RA) è stata acquistata presso SIGMA CHEMICAL (St. Louis Mo). La polvere è stata ricostituita in dimetilsolfossido (DMSO) alla concentrazione stock di 100 mM e conservata a -80°C.

L'acido metafosforico (MPA), l'acido tricloroacetico (TCA), l'acido 2-tiobarbiturico (TBA), orto-oftaldeide (OPA), 1,1,3,3 tetrametossipropano, acido dietilentriaminapentacetico (DETAPAC), ditiotreitolo (DTT), acido sulfosalicilico (SSA), N-etilenmaleimmide (NEM), l'inibitore selettivo di FLAP, MK886, l'inibitore BADGE (Bhisphenol A Diglycidyl Ether), specifico per PPAR- γ , e tutti i tamponi utilizzati sono stati acquistati presso SIGMA CHEMICALS (St Louis Mo).

ANNEXIN V-FITC/IP è stata acquistata presso Bender Med System.

Il probe diclorofluoresceina-diacetato (DCFH-DA), sensibile allo stato ossidativo intracellulare, è stato acquistato presso Molecular Probes.

Proliferazione cellulare

Le cellule sono state piastrate in piastre da 6 pozzetti alla concentrazione di 2×10^5 cellule/pozzetto lasciate aderire per 24 ore. Dopo aver raggiunto il 60% di confluenza sono state trattate con medium fresco preventivamente aggiunto di concentrazioni variabili di DHA (50, 100, 150, 200 μM) per tempi di trattamento di 24, 48 e 72 ore.

Dopo gli appropriati periodi di trattamento le cellule trattate e non, sono staccate dai pozzetti di coltura con una soluzione di tripsina/EDTA e lavate con

PBS (Phosphate Buffer Saline) freddo. La proliferazione cellulare è stata analizzata contando il numero di cellule con e senza trattamento di acido grasso, tramite camera di Neubauer, utilizzando il colorante vitale Trypan-Blue.

Apoptosi cellulare mediante ANNEXIN V

La percentuale di cellule apoptotiche “early” è stata analizzata secondo il protocollo previsto dal Kit ANNEXIN V-FITC (Bender Med System). Brevemente, le cellule sono state piastrate in piastre da 6 pozzetti alla concentrazione di 2×10^5 cellule/pozzetto lasciate aderire per 24 ore e, dopo aver raggiunto il 60% di confluenza, sono state trattate con medium fresco preventivamente supplementato con DHA alla concentrazione 200 μ M per 6, 18, 24 e 48 ore. Dopo gli appropriati periodi di trattamento, le cellule sono state staccate dalle piastre di coltura con una soluzione tripsina/EDTA e lavate in PBS. Dopodiché alla sospensione cellulare è stata aggiunta una soluzione binding buffer (10mM Hepes, NaCl 140mM, CaCl_2 2.5 mM)/ annexin V (1 mg/ml) ed incubata al buio per 10 minuti a 37°C. La fase finale di preparazione del campione preclude il lavaggio in PBS e l’aggiunta di una soluzione di ioduro di propidio (PI) alla concentrazione finale di 1 μ g/ml. La fluorescenza emessa dalle cellule è stata analizzata al citofluorimetro (FACScalibur, Becton-Dickinson) attraverso il software CellQuest acquisendo 10^4 cellule (eventi) per campione ed utilizzando il grafico di popolazione “dot plot”, dove ad ogni punto corrisponde una singola cellula (evento) con uno specifico segnale di fluorescenza in riferimento agli assi, Annexin V-FITC fluorescenza verde, in ordinata, vs PI fluorescenza rossa, in ascissa.

Apoptosi e ciclo cellulare mediante ioduro di propidio (PI)

L'analisi dell'apoptosi è stata condotta marcando le cellule con ioduro di propidio (PI), un colorante fluorescente che si intercala al DNA, in accordo con il protocollo di Nicoletti, Migliorati et al. (1991). Con tale metodo l'apoptosi viene valutata analizzando il contenuto ipoploide di DNA, risultato della fluorescenza emessa dai corpi apoptotici contenenti non solo citoplasma ma anche frammenti di materiale genetico. Brevemente, dopo trattamento con DHA le cellule sono staccate dalla piastre di coltura con una soluzione tripsina/EDTA, lavate in PBS freddo e trattate con una soluzione ipotonica contenente PI (PI 50 µg/ml, 0.1% sodio citrato e 0.1 % di Triton X-100) (500 µl/ 10⁶ cellule). I campioni sono quindi incubati per 1 ora a 4°C ed analizzati al citofluorimetro (FACScalibur, Becton-Dickinson). La fluorescenza emessa dalle cellule è stata analizzata attraverso il software CellQuest acquisendo 5x10³ cellule (eventi)/campione ed utilizzando il canale di fluorescenza rossa, caratteristico per PI (FL-2), su parametri in scala logaritmica. La curva di fluorescenza ottenuta dall'elaborazione dei dati, detta Histogram Plot, presenta due picchi, il primo dei quali rappresenta la fase G1 del ciclo cellulare, interposta tra la fine della mitosi e l'inizio della sintesi del DNA, ed il secondo picco è indicativo della fase G2 pre-mitotica. La depressione tra i due picchi rappresenta la fase di sintesi del DNA o fase S. La percentuale di cellule apoptotiche è stata determinata sulla base del numero di picchi aneuploidi, antistanti il picco della fase G1, utilizzando il marker M1. Le stesse condizioni sono state utilizzate per lo studio del ciclo cellulare dopo trattamento con DHA, con la differenza che l'acquisizione del segnale di fluorescenza è avvenuta con modalità lineare e sono stati utilizzati due marker relativi alle diverse fasi del ciclo cellulare (M1/G1; M2/S, G2, M).

Determinazione del glutathione ridotto (GSH) ed ossidato (GSSG)

Le concentrazioni della forma ridotta e della forma ossidata del glutathione sono analizzate tramite HPLC (High Performance Liquid Chromatography) in accordo con il protocollo di Neuschwander-Tetri (1989). 4×10^5 cellule sono state piastrate in flasks da 25 cm^2 e lasciate aderire per 48 ore, raggiunto il 60% di confluenza il medium di coltura è stato sostituito con terreno fresco preventivamente supplementato con DHA alla concentrazione $200 \mu\text{M}$ per 3, 6, 18 e 24 ore di trattamento. Dopo gli appropriati periodi di trattamento le cellule sono staccate dalle flask di coltura con la soluzione trypsin/EDTA, lavate in PBS freddo e lisate con 1ml di buffer 10 mM Tris-HCl (pH 6.0) contenente 0.5 M di DETAPAC (acido dietilentriaminapentacetico). Per l'analisi di glutathione totale (GSH/GSSG) sono stati prelevati 50 μl di lisato cellulare e trattati con 100 μl di DTT (ditiotreitolo) 25 mM e 150 μl di una soluzione Tris-HCl 0,1 M pH 8.5.

Per la determinazione della sola forma ossidata GSSG, sono stati prelevati 150 μl di sospensione cellulare e trattati con 50 μl di NEM 2 mM (N-etilenmaleimmide), 50 μl di una soluzione Tris-HCl 0,1 M pH 8.5 e 50 μl DTT 50 mM.

Ad ambedue le soluzioni è stata aggiunta una soluzione di SSA (acido sulfosalicilico) 2.5% per precipitare le proteine e centrifugate a 13000g per 4 minuti a 4°C . Segue la fase di derivatizzazione per cui sono recuperati 100 μl di sovranatante cui sono stati aggiunti 100 μl di una soluzione 37.3 mM di OPA (orto-oftaldeide), fluorocromo che si lega al gruppo amminico del GSH, e 1 ml di Tris-HCl 150 mM pH7.0. Le soluzioni derivatizzate sono filtrate con filtri da $0.45 \mu\text{m}$ e 100 μl sono iniettati in HPLC per evidenziare la presenza dell'addotto GSH-OPA.

La colonna utilizzata per la separazione e l'analisi è Supelcosil™ LC-18 ($25 \text{ cm} \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$, SUPELCO) con un flusso di 1.5 ml/min di Na/acetato 0.15 M pH5.0 come fase mobile. La colonna è stata salvaguardata da una pre-

colonna Supelguard™ LC-18 (1cm x 10 mm, SUPELCO). La lettura viene effettuata in fluorimetria a 420 nm di emissione dopo eccitazione a 340 nm.

Lo standard è costituito da GSH ridotto trattato come il campione e iniettato in HPLC a concentrazione nota.

Tutti i valori del GSH totale e del GSSG sono espressi in nmoli/mg di proteina. La concentrazione proteica è stata determinata mediante test colorimetrico “Bio-Rad Protein Assay” (BIO-RAD) utilizzando come curva standard l’assorbanza a 595 nm di concentrazioni note di albumina bovina purificata (BSA; 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2.5 µg/ml , 1 µg/ml) nell’intervallo in cui il rapporto Assorbanza/concentrazione risultava lineare.

Misura della perossidazione lipidica

La malondialdeide (MDA), prodotto della perossidazione lipidica, viene determinata per separazione in HPLC e lettura in spettrofluorimetria. A tale scopo 4×10^5 cellule sono state piastrate in flasks da 25 cm² e lasciate aderire per 48 ore, raggiunto il 60% di confluenza il medium di coltura è stato sostituito con terreno fresco preventivamente supplementato con DHA alle concentrazioni 50, 100, 150 e 200 µM per 3, 6, 18 e 24 ore di trattamento. Dopo gli appropriati periodi di trattamento le cellule sono staccate dalle flasks di coltura con la soluzione tripsina/EDTA e lavate con PBS freddo. Dopodiché le cellule sono risospese in 500 µl di una soluzione di PBS/10% BHT (butilato idrossi-toluene) e sonicate ad intensità media per 10 secondi. Dall’omogenato cellulare sono prelevati 200 µl a cui sono aggiunti 600 µl di una soluzione 0.44 M di acido fosforico, segue una incubazione di 10 minuti a temperatura ambiente e l’aggiunta di 200 µl di TBA (acido tiobarbiturico) 0.6 %. I campioni sono quindi riscaldati a 90°C per 30 minuti e raffreddati a temperatura ambiente. Alla miscela vengono aggiunti 2 ml di n-butanolo, segue l’agitazione su vortex per almeno 40 secondi e centrifugazione a 1500 RPM per 5 minuti. Viene recuperata la fase butanolica sovranatante e portata a

secco sotto flusso d'azoto. A questo punto il campione è ripreso in 500 µl di fase mobile. Dopo filtrazione su filtri da 0.45 µm, 20 µl di campione sono iniettati in HPLC. La separazione di MDA viene effettuata con una colonna Supelcosil™ LC-18 (15 cm x 4.6 mm, 5 µm, SUPELCO) utilizzando come fase mobile una soluzione 65% KH₂PO₄ e 35% metanolo ad un flusso di 1 ml/min. La colonna è stata salvaguardata da una pre-colonna Supelguard™ LC-18 (1cm x 10 mm, SUPELCO). La lettura viene effettuata in fluorimetria a 553 nm di emissione dopo eccitazione a 515 nm.

Lo standard, costituito da 1,1,3,3 tetrametossipropano, viene trattato come il campione e iniettato a concentrazioni note in HPLC.

Tutti i valori di MDA sono espressi in pmoli/mg di proteina. La concentrazione proteica è stata determinata mediante test colorimetrico “Bio-Rad Protein Assay” (BIO-RAD) utilizzando come curva standard l'assorbanza a 595 nm di concentrazioni note di albumina bovina purificata (BSA; 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2.5 µg/ml , 1 µg/ml) nell'intervallo in cui il rapporto Assorbanza/Concentrazione risultava lineare.

Misura dello stato redox cellulare

Per misurare lo stato redox cellulare e i livelli di perossidi intracellulari è stato utilizzato il probe specifico per perossido d'idrogeno, diclofluoresceina diacetato (DCFH-DA, MOLECULAR PROBES) secondo il protocollo previsto dalla casa produttrice. Le cellule sono state piastrate in piastre da 6 pozzetti alla concentrazione di 2×10^5 cellule/pozzetto lasciate aderire per 24 ore e, dopo aver raggiunto il 60% di confluenza, sono state trattate con medium fresco preventivamente supplementato con DHA alla concentrazione 50, 100, 150 e 200 µM per tempi di trattamento di 6, 18, 24. Dopo gli appropriati periodi di trattamento e dopo aver eliminato il medium di coltura, le cellule sono incubate in piastra con una soluzione DCFH-DA/PBS alla concentrazione 10 µM per 15 minuti al buio a 37°C. Terminato il tempo di incubazione le

cellule sono staccate con una soluzione tripsina/EDTA e la loro fluorescenza viene analizzata al citofluorimetro (FACScalibur, Becton-Dickinson) attraverso il software CellQuest acquisendo 10^4 cellule (eventi) per campione.

Misura dell'attività dell'enzima Glutathione Perossidasi (GPx)

La misura dell'attività dell'enzima glutathione perossidasi (GPx) è stata svolta in accordo con il protocollo di Flohè and Gunzler (1984). A tale scopo 4×10^5 cellule sono state piastrate in flasks da 25 cm^2 e lasciate aderire per 48 ore, raggiunto il 60% di confluenza il medium di coltura è stato sostituito con terreno fresco preventivamente trattato con DHA alla concentrazione $200 \text{ }\mu\text{M}$ per 3, 6, 18 e 24 ore. Dopo gli appropriati periodi di trattamento le cellule sono staccate dalle flasks di coltura con la soluzione tripsina/EDTA, lavate con PBS freddo e centrifugate. Al pellet cellulare è stato aggiunto un buffer di lisi (Tris-HCl 10 mM , KCl 300 mM , Triton-X $100 \text{ 1\%}$) e sonicato a bassa frequenza ad intervalli di 6-7 secondi per 4-5 volte. Gli omogenati così ottenuti sono stati centrifugati per 15 minuti a 10000 RPM ed i sovranatanti utilizzati per la misura dell'attività di GPx secondo il metodo spettrofotometrico. Tale metodo è basato sul monitoraggio dell'ossidazione di NADPH a 340 nm , e l'attività dell'enzima è stata calcolata utilizzando il coefficiente di estinzione molare per NADPH.

I valori di attività sono stati espressi come mU/mg di proteina, considerando che 1 unità di GPx consuma $1 \text{ }\mu\text{mole}$ di NADPH per minuto.

La concentrazione proteica è stata determinata mediante test colorimetrico "Bio-Rad Protein Assay" (BIO-RAD) utilizzando come curva standard l'assorbanza a 595 nm di concentrazioni note di albumina bovina purificata (BSA; $10 \text{ }\mu\text{g/ml}$, $5 \text{ }\mu\text{g/ml}$, $2.5 \text{ }\mu\text{g/ml}$, $1 \text{ }\mu\text{g/ml}$) nell'intervallo in cui il rapporto Assorbanza/ Concentrazione risultava lineare.

Estrazione di RNA totale

L'estrazione di RNA totale è stata svolta utilizzando TRI REAGENT™ (SIGMA) secondo il protocollo previsto dalla casa produttrice. In breve, 2×10^5 cellule sono piastrate in piastre da 6 pozzetti lasciate aderire per 24 ore e, dopo aver raggiunto il 60% di confluenza, il medium è stato sostituito da terreno fresco preventivamente aggiunto di DHA alla concentrazione di 200 μM per tempi di trattamento di 3, 6, 18, 24 ore. Dopo gli appropriati periodi di trattamento le cellule sono staccate con una soluzione di tripsina/EDTA e lavate in PBS freddo. Ai campioni vengono quindi aggiunti 800 μl di TRIZOL e lasciati per 5 minuti a temperatura ambiente. La fase successiva di estrazione è eseguita aggiungendo 160 μl di cloroformio ad ogni campione e che verrà poi centrifugato per 15 minuti 12000 RPM. Viene recuperato il surnatante e aggiunto di 500 μl di isopropanolo, i campioni sono quindi centrifugati per far precipitare RNA. A seguito di ripetuti lavaggi con etanolo al 75%, il pellet di RNA è portato a secco e solo successivamente risospeso in 20 μl di H_2O -DEPC (dietilpirocarbonato). La concentrazione dell'RNA estratto è stata determinata misurando l'assorbanza dei campioni alla lunghezza d'onda di 260 nm, caratteristica degli acidi nucleici, mediante l'uso di uno spettrofotometro a doppio raggio. Dal valore della densità ottica è stato possibile ricavare la concentrazione dell'RNA secondo la seguente formula $1 \text{ O.D.} = 40 \mu\text{g RNA}$ e normalizzarla a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

La qualità dell'RNA totale estratto è stata valutata sia analizzando il rapporto di assorbanza dei campioni alle lunghezze d'onda di 260 e 280 nm (Abs 260/280 nm), per valutare la possibile contaminazione da proteine, sia con una corsa elettroforetica su gel d'agarosio 1%.

Retrotrascrizione e reazione a catena della polimerasi (RT-PCR)

Gli RNA totali estratti sono stati retrotrascritti in DNA complementare (cDNA) utilizzando l'enzima trascrittasi inversa ImProm-II™ Reverse Transcriptase (PROMEGA) secondo il protocollo fornito dalla ditta, utilizzando il primer di poli-timina (Oligo(dT)₁₅, PROMEGA) specifico per le code poli-A del mRNA. 4 µg (4 µl) di RNA totale è stato incubato a 70°C per 5 minuti e subito raffreddato a 4°C per denaturare eventuali strutture secondarie e permettere l'appaiamento dell'oligo(dT) all'RNA. Segue una incubazione del campione in una miscela composta da RT buffer (Tris-HCl 50 mM pH 8.3, KCl 75 mM, DTT 10 mM), MgCl₂ 3 mM, 0.5 mM dNTP mix e 50 U dell'enzima ImProm-II™ Reverse Transcriptase a 42°C per 1 ora.

I cDNA retrotrascritti sono quindi amplificati in una fase successiva con la tecnica PCR (Polymerase Chain Reaction). La tecnica utilizza i cDNA neosintetizzati come stampo e dei primers specifici come innesco alla reazione di amplificazione che viene mediata dall'enzima Taq-Polimerasi (GoTaq™ DNA Polymerase, PROMEGA). Si effettuano un numero minimo di 30 cicli, che possono variare in base alla porzione di DNA da amplificare, dove un singolo ciclo consiste di 3 fasi: un primo step di denaturazione della doppia elica di DNA a 94°C, la seconda fase è caratterizzata dall'appaiamento dei primers specifici per la porzione da amplificare secondo un regime termico strettamente dipendente dal tipo di primer utilizzato, e la terza fase prevede l'estensione del gene target grazie all'attività della Taq polimerasi facilitata dalla sua temperatura ottimale (72°C).

La reazione di PCR viene condotta per 2 µl di cDNA retrotrascritto in 50 µl di una miscela di reazione contenente 10 mM di Tris-HCl, 50 mM di KCl, 1.5 mM di MgCl₂, 0.2 mM di dNTP Mix, 0.5 µM di primer 5' e 3' e 1.25 U di GoTaq™ DNA Polymerase. Come controllo interno è stato amplificato il gene “ housekeeping” costitutivamente espresso e codificante per la proteina β-actina. Le sequenze dei primers utilizzati per l'amplificazione sono:

β -actina 5' GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA

β -actina 3' CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC (frammento di 538 bp)

PPAR- α 5' AGA TTT CGC AAT CCA T

PPAR- α 3' AGG ATA AGT CAC CGA G (frammento di 146 bp)

PPAR- γ 5' CTG CCA GTT TCG CTC C

PPAR- γ 3' AGG CCA GCA TTG TGT A (frammento di 294 bp)

LOX 15-1 5' CCA ACG TCA TTC TCT G

LOX 15-1 3' GGA TGT ATC GAC GGC A (frammento di 295 bp)

LOX 15-2 5' CAC ATC AAC ACA CTC G

LOX15-2 3' CAC GGT AGT AGTAGC C (frammento di 191 bp)

LOX-12 5' CCC ATA CCC GAT ACA C

LOX-12 3' TCG CGG TAG TAA TAT CC (frammento di 214 bp)

LOX-3 5' CAC GAA AAC AAC ACG C

LOX-3 3' GTG TAT CGA GTG TGG G (frammento di 125 bp)

LOX-5 5' CCA AAG CGA TGG AGA ACC TG

LOX-5 3' GCA GAA GGT GGG TGA TGG TC (frammento di 228 bp)

LOX-5-AP (FLAP) 5' CTT TGA GCG GGT CTA C

LOX-5- AP 3' GTG TAT CGA GTG TGG G (frammento di 310 bp)

PH-GP_x 5' TGT GCG CGC TCC ATG CAC GAG T

PH-GPx 3' AAA TAG TGG GGC AGG TCC TTC TCT (frammento di 481 bp)

c-GPx 5' TTC CCG TGC AAC CAG TTT G

c-GPx 3' TTC ACC TCG CAC TTC TCG AA (frammento 324bp)

COX-2 5' AGA TCA TAA GCG AGG G

COX-2 3' CTG TGG GAG GAT ACA T (frammento di 213 bp)

I frammenti di cDNA ottenuti dalla reazione di RT-PCR sono stati separati mediante elettroforesi su gel d'agarosio subacqueo (1%) al quale è stato aggiunto bromuro d'etidio alla concentrazione 0.25 mg/ml che intercalandosi negli acidi nucleici permette una più facile visualizzazione dei risultati alla luce UV. La corsa elettroforetica è stata condotta con un power-supply ad un voltaggio costante di 120 V per 30 minuti. Per identificare i vari frammenti amplificati è stato utilizzato un peso molecolare da 100 bp (SIGMA) come riferimento.

Analisi della frammentazione del DNA

La frammentazione del DNA è stata valutata utilizzando Wizard® Genomic DNA Purification Kit (PROMEGA) secondo il protocollo della casa produttrice. Brevemente 4×10^5 cellule sono state piastrate in flasks da 25 cm² e lasciate aderire per 48 ore, raggiunto il 60% di confluenza il medium di coltura è stato sostituito con terreno fresco preventivamente aggiunto di DHA alle concentrazioni 50, 100, 150 e 200 µM per 48 ore di trattamento. Dopo il periodo di trattamento le cellule sono state staccate dalle piastre di coltura con la soluzione tripsina/EDTA e lavate in PBS freddo. Le cellule sono state trattate con un buffer di estrazione, lisate e centrifugate a 13000 RPM per 4 minuti. Il sovrnatante, contenente DNA, è stato recuperato e preparato per la

precipitazione del DNA. Dopo varie centrifugazioni il DNA viene essiccato ed in seguito reidratato e normalizzato alla concentrazione di 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Il DNA estratto è quindi caricato su gel d'agarosio 1% già aggiunto di bromuro d'etidio (0.25 mg/ml) per visualizzare agli UV la frammentazione caratteristica dell'attivazione del processo apoptotico.

§ 4. RISULTATI

4.1 DHA inibisce la proliferazione cellulare bloccando le cellule nella fase G1 del ciclo.

Le cellule PaCa-44 in coltura sono state trattate con DHA alle concentrazioni di 50, 100, 150 e 200 μM e la loro proliferazione e lo stato del ciclo cellulare sono stati analizzati dopo 24, 48 e 72 ore di trattamento.

Il DHA ha inibito la proliferazione delle cellule tumorali (**Fig. 1A**) con una modalità tempo- e dose-dipendente, rivelando la massima inibizione per trattamenti alla concentrazione di 200 μM . Dall'analisi del ciclo cellulare (**Fig. 1B**) si nota un blocco cellulare in fase G1 tanto più pronunciato quanto più è elevata la concentrazione dell'acido grasso dopo sole 24 ore di trattamento.

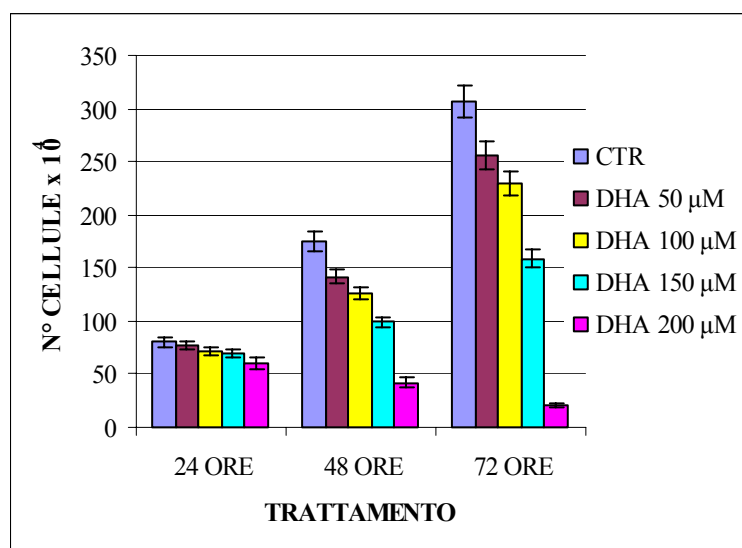
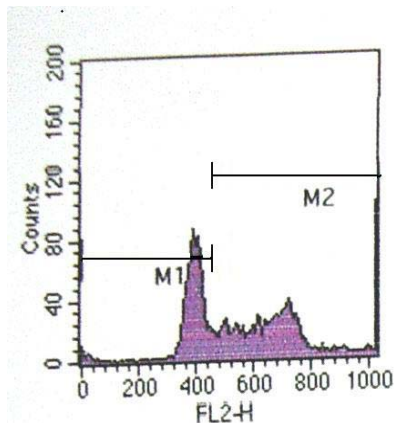


Fig.1.A

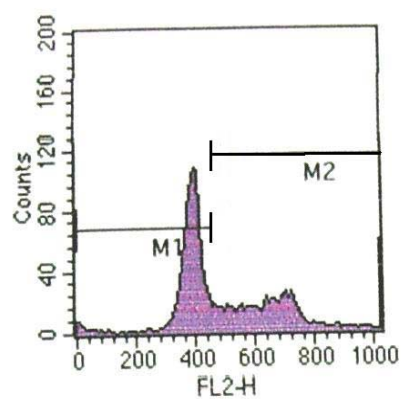
CONTROLLO



CONTROLLO

M1/G1	47.56%
M2/S/G2/M	52.57%

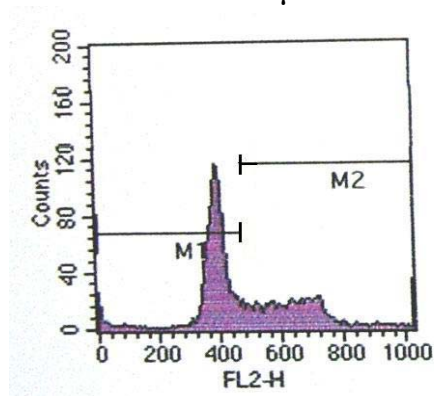
DHA 50 μ M



DHA 50 μ M

M1/G1	54.95%
M2/S/G2/M	45.72%

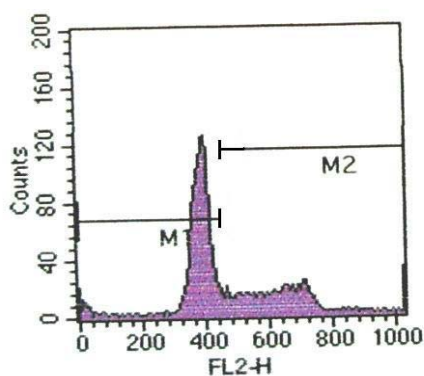
DHA 100 μ M



DHA 100 μ M

M1/G1	61.82%
M2/S/G2/M	38.25%

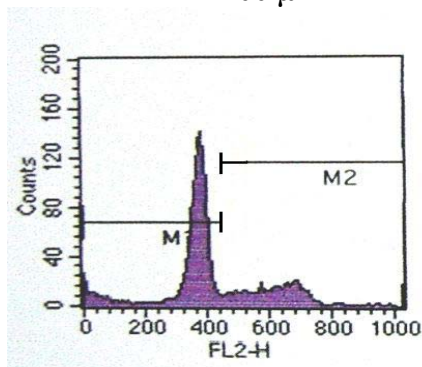
DHA 150 μ M



DHA 150 μ M

M1/G1	68.93%
M2/S/G2/M	31.18%

DHA 200 μ M



DHA 200 μ M

M1/G1	75.81%
M2/S/G2/M	24.24%

Fig.1.B

Fig. 1. Il DHA inibisce la proliferazione cellulare bloccando le cellule nella fase G1 del ciclo. (A) Proliferazione cellulare. La linea cellulare PaCa-44 è stata trattata con diverse concentrazioni di DHA (50, 100, 150, 200 μ M) e incubata per 24, 48 e 72 ore. La proliferazione è stata valutata con Trypan-Blue. I valori sono stati espressi come numero di cellule (N°) $\times 10^4$. I dati presentati sono espressi come media $\pm$ SD di tre esperimenti indipendenti. (B) Analisi del ciclo cellulare. Le cellule PaCa-44 sono incubate a diverse concentrazioni di DHA (50, 100, 150, 200 μ M) per 24 ore, colorate con una soluzione ipotonica di PI e la fluorescenza emessa è stata analizzata al citofluorimetro. FL-2 rappresenta l'intensità di fluorescenza emessa da PI. I dati presentati sono relativi ad un esperimento rappresentativo di tre esperimenti indipendenti con risultati simili.

4.2 Il DHA induce apoptosi nella linea di adenocarcinoma pancreatico umano Paca-44

Per esaminare se l'inibizione della crescita cellulare fosse associata con l'induzione della morte cellulare programmata, le cellule sono state incubate con le quattro concentrazioni di acido grasso DHA (50, 100, 150, 200 μ M) per diversi tempi di trattamento. L'analisi dell'attivazione del programma apoptotico è stata effettuata utilizzando: il test dell'annexina V (**Fig.2**), il metodo con il colorante ioduro di propidio (PI) in soluzione ipotonica (**Fig.3**), e, per confermare i dati ottenuti, la frammentazione del DNA (**Fig.4**). Nelle **Tabelle 1** e **2** i valori percentuali di apoptosi ricavati rispettivamente dall'analisi con annexina V e con il colorante PI rivelano come il DHA induca apoptosi nella linea cellulare PaCa-44 con una modalità tempo- e dose-dipendente presentando la massima attività per le concentrazioni più elevate di 150 e 200 μ M e tempi di trattamento più lunghi.

% APOPTOSI

	6 ORE	18 ORE	24 ORE	48 ORE
CTR	7.27 ± 0.7	6.92 ± 1.3	6.69 ± 1.1	5.37 ± 0.9
DHA 50 µM	6.95 ± 1.4	7.1 ± 1.0	10.5 ± 0.5	12.1 ± 1.5
DHA 100 µM	8.2 ± 0.2	8.3 ± 2.6	11.2 ± 3.1	13.4 ± 1.2
DHA 150 µM	5.6 ± 1.4	9.4 ± 2.5	17.7 ± 2.3	20.2 ± 2.5
DHA 200 µM	7.63 ± 1.3	15.2 ± 1.9	20.56 ± 3.4	28.01 ± 4.8

Tabella 1. Le cellule PaCa-44 sono state trattate con diverse concentrazioni di DHA, 50, 100, 150 e 200 µM per tempi di trattamento di 6, 18, 24 e 48. Al termine di ciascuna incubazione le cellule sono state colorate con Annexina V/PI e la loro fluorescenza analizzata al citofluorimetro. I risultati sono espressi come valori percentuali di apoptosi. Le medie e le deviazioni standard sono state calcolate dai risultati ottenuti in 3 esperimenti indipendenti.

% APOPTOSI

	24 ORE	48 ORE	72 ORE
CTR	5.34 ± 2.1	4.02 ± 1.6	6.7 ± 3.1
DHA 50 µM	7.3 ± 1.3	10.2 ± 1.6	11.4 ± 2.6
DHA 100 µM	6.9 ± 3.2	10.5 ± 3.8	14.7 ± 5.3
DHA 150 µM	15.2 ± 4.5	20.2 ± 4.7	30.5 ± 4.9
DHA 200 µM	19.7 ± 2.3	31.84 ± 5.2	50.5 ± 7.8

Tabella 2. Analisi dell'apoptosi DHA-indotta attraverso colorazione con PI. Le cellule sono state trattate con DHA a diverse concentrazioni (50, 100, 150, 200 µM) e tempi di incubazione di 24, 48, 72 ore. Terminato il periodo di incubazione sono state colorate con PI e la fluorescenza emessa analizzata al citofluorimetro. I risultati sono espressi come valori percentuali di apoptosi. Le medie e le deviazioni standard sono state calcolate dai risultati ottenuti in 3 esperimenti indipendenti.

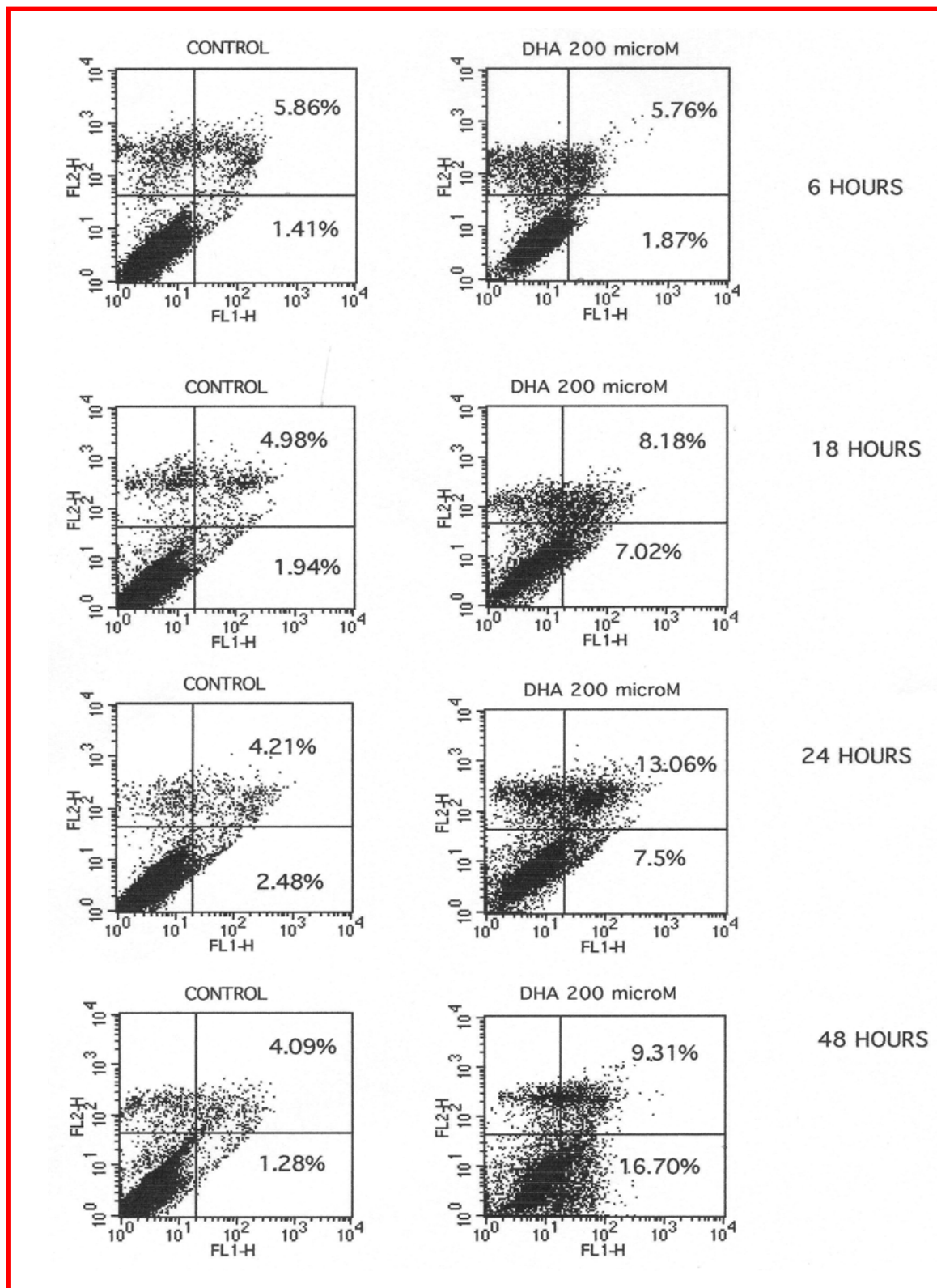


Fig. 2. Visualizzazione del grafico di popolazione dell'apoptosi DHA-indotta per trattamenti di 6, 18, 24 e 48 ore con DHA 200 μ M analizzata tramite annexina V. FL-1, annexin V vs FL-2 PI. Lo spostamento della popolazione verso livelli maggiori di fluorescenza FL-1 attesta l'apoptosi cellulare. I dati presentati sono relativi ad un esperimento rappresentativo di tre esperimenti indipendenti con risultato simile.

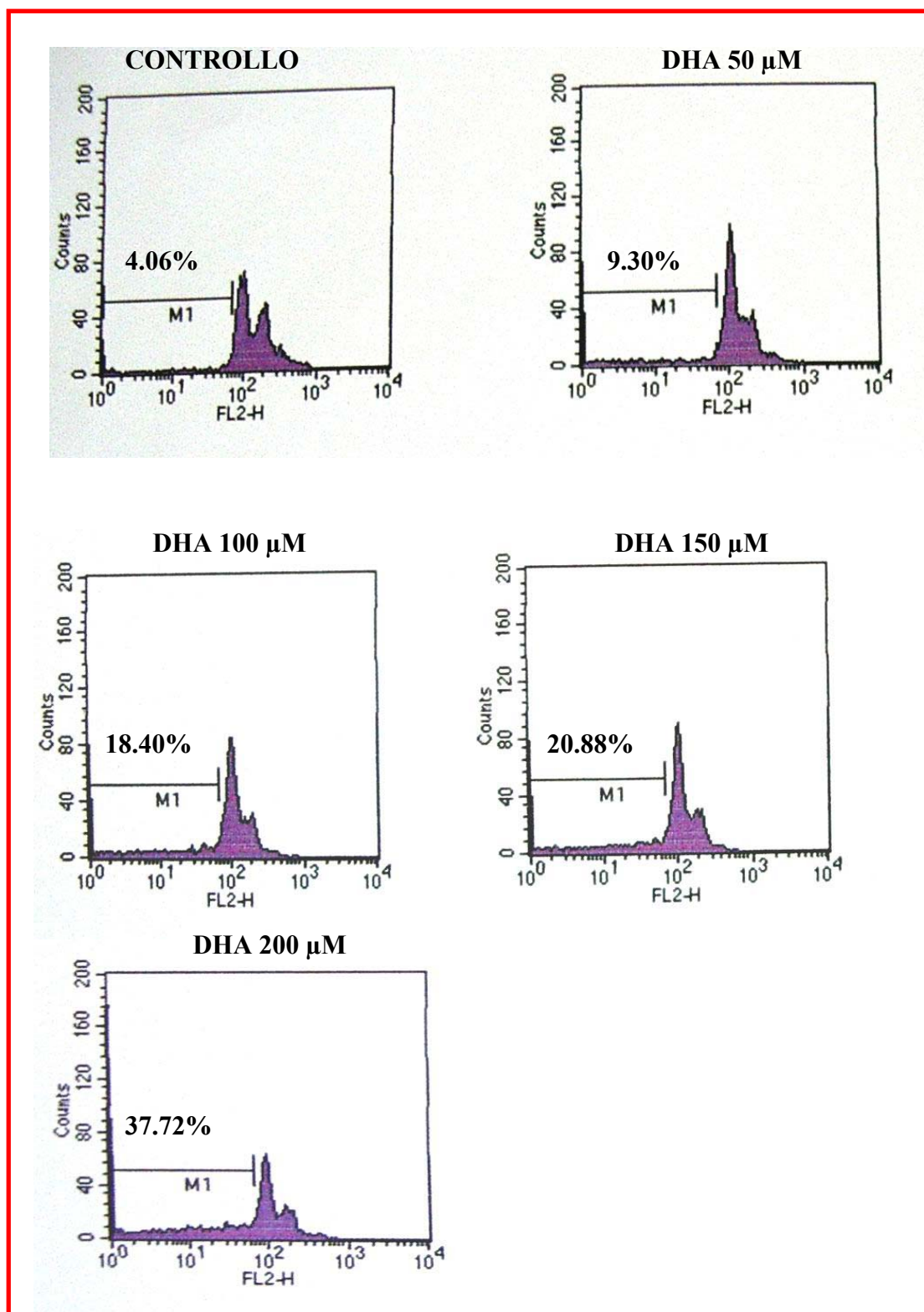


Fig. 3. Visualizzazione dell'istogramma di fluorescenza dell'apoptosi DHA-indotta in cellule PaCa-44 dopo colorazione PI ed analisi citofluorimetrica. In tabella sono riportati i valori in percentuale dell'apoptosi ottenuta per le diverse concentrazioni di DHA utilizzate dopo 48 ore di incubazione. I dati presentati sono relativi ad un esperimento rappresentativo di tre esperimenti indipendenti con risultato simile.

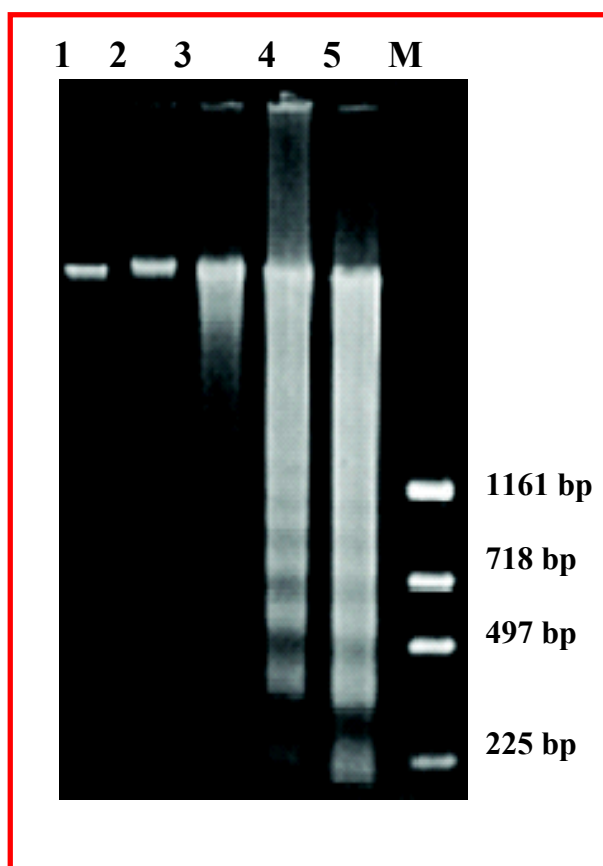


Fig. 4. Frammentazione del DNA. Le cellule PaCa-44 sono state trattate per un unico tempo di incubazione di 48h con diverse concentrazioni di DHA (50, 100, 150, 200 μ M) e sottoposte ad estrazione di DNA come descritto in Materiali e Metodi.

I dati presentati sono relativi ad un esperimento rappresentativo di tre esperimenti indipendenti con risultati simili.

Linea 1: CTR; Linea 2: DHA 50 μ M; Linea 3: DHA 100 μ M; Linea 4: DHA 150 μ M; Linea 5: DHA 200 μ M; M: Peso

4.3 L'effetto pro-apoptotico è specifico del DHA.

Per verificare se l'effetto anti-proliferativo e pro-apoptotico del DHA nella linea PaCa-44 fosse per esso specifico, sono state valutate proliferazione cellulare ed apoptosi dopo trattamento con altri tipi di acidi grassi con caratteristiche chimiche diverse. Sono stati quindi utilizzati gli acidi grassi: linoleico (LA, 18:2, n-6), a catena lunga e diinsaturo, oleico (OA, 18:1, n-9), a catena lunga monoinsaturo e butirrico (BA, 4:0) a catena corta e assente di insaturazioni, alla concentrazione unica di 200 μ M per tempi di trattamento di 24, 48 e 72 ore. Come si nota dalla **Fig. 5.A e B**, tutti gli acidi grassi testati hanno inibito la proliferazione delle cellule tumorali, ma solo per trattamenti con DHA si nota un consistente aumento della percentuale di corpi apoptotici.

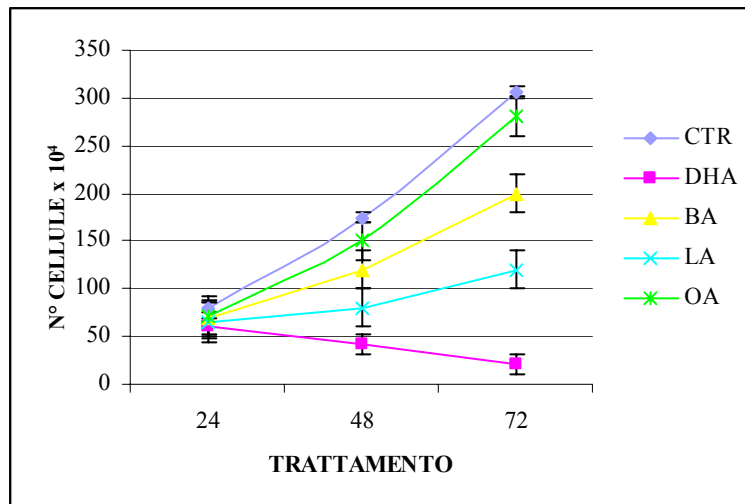


Fig. 5.A

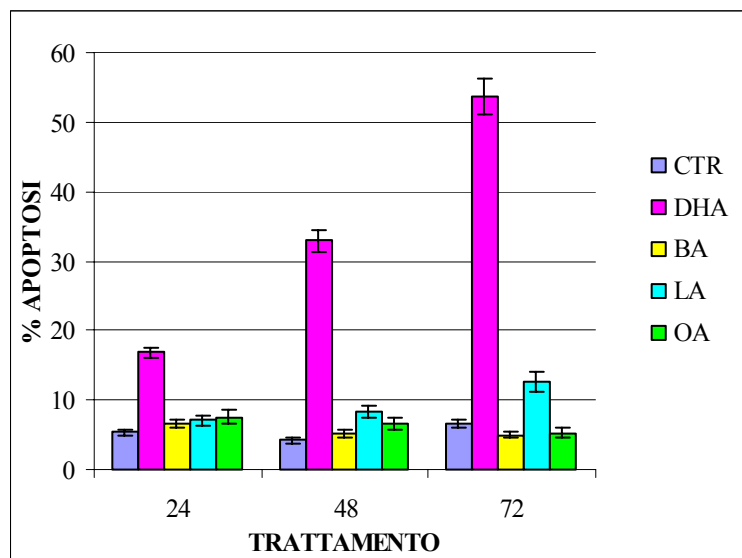


Fig. 5.B

Fig. 5. L'effetto pro-apoptotico è DHA-specifico. (A) Proliferazione cellulare. La linea cellulare PaCa-44 è stata trattata con diversi acidi grassi (DHA, LA, BA, OA) alla concentrazione di 200 μ M e incubata per 24, 48 e 72 ore. La proliferazione è stata valutata con Trypan-Blue. I valori sono stati espressi come numero di cellule (N°) $\times 10^4$. (B) Analisi dell'apoptosi con PI. Le cellule PaCa-44 sono incubate con diversi acidi grassi (DHA, LA, BA, OA) alla concentrazione di 200 μ M per 24, 48, 72 ore, colorate con una soluzione ipotonica di PI e la fluorescenza emessa è stata analizzata al citofluorimetro. I risultati sono espressi come media $\pm$ SD di tre indipendenti indipendenti.

4.4 Effetto dei composti antiossidanti sull'apoptosi DHA- indotta

Per analizzare il possibile coinvolgimento di un disequilibrio redox nel processo apoptotico DHA-indotto nelle cellule PaCa-44, sono stati misurati i livelli di ROS intracellulari e la percentuale di apoptosi, dopo trattamento con il solo DHA a diverse concentrazioni (50, 100, 150, 200 μ M), e co-trattamento con diversi composti antiossidanti quali α -tocoferolo acetato (Vitamina E, 40 μ M), acido ascorbico (Vitamina C, 40 μ M) e l'antiossidante di sintesi BHT (Butilato Idrossitoluene, 10 μ M) aggiunti al medium di coltura con 1 ora di anticipo rispetto al DHA. Lo stato redox intracellulare è stato valutato attraverso il probe DCFH-DA (10 μ M) la cui fluorescenza, analizzata al citofluorimetro, è proporzionale al contenuto di ROS intracellulare; per lo studio dell'apoptosi è stato invece utilizzato il colorante PI.

Come si evince dalle **Fig. 6.A** e **6.B**, il trattamento con DHA induce una variazione significativa dello stato redox intracellulare dopo 24 ore di trattamento, che ritorna al livello di controllo a seguito di co-trattamento con i composti antiossidanti. Inoltre tali composti hanno completamente inibito l'apoptosi DHA-indotta (**Fig.7**). I risultati dimostrano quindi il coinvolgimento di un meccanismo ossidativo nel processo di morte cellulare programmata indotto dal DHA. Trattamenti con i soli composti antiossidanti hanno diminuito i livelli di ROS intracellulari (dato non presentato) e non hanno modificato la percentuale di cellule apoptotiche rispetto ai valori del controllo.

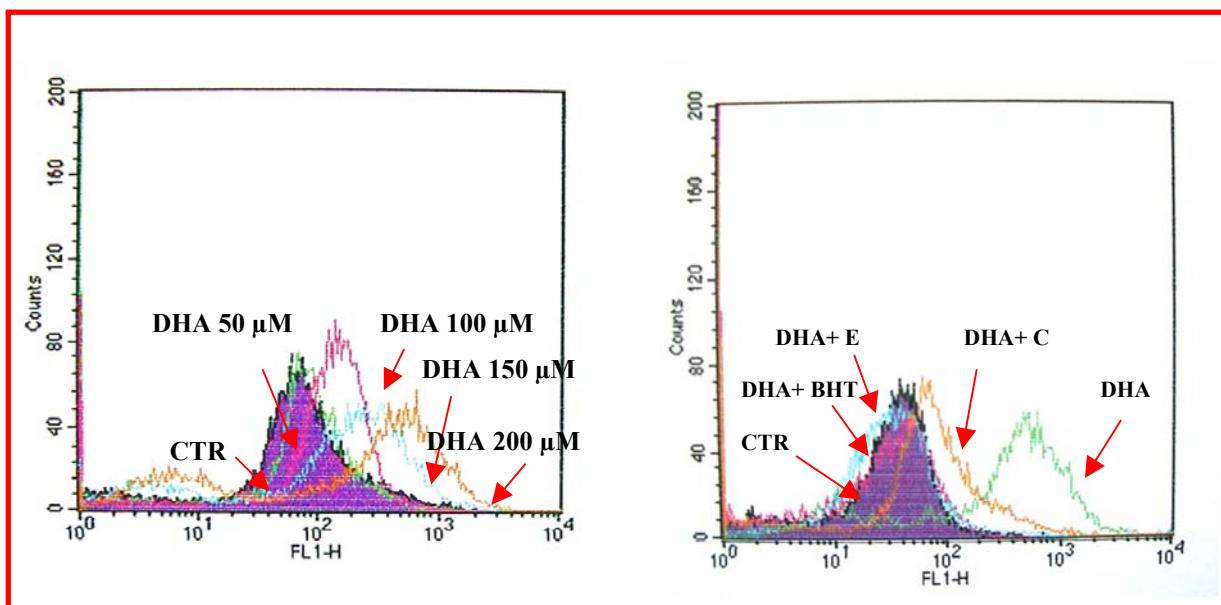


Fig. 6.A.

Fig. 6.B

Fig. 6. Il DHA induce una variazione dello stato redox cellulare. Le cellule PaCa-44 sono state incubate con il solo DHA (50, 100, 150, 200 μM) (**6.A**), e DHA (200 μM) supplementato con Vit.E, Vit.C e BHT (**6.B**) per un unico tempo di 24 ore. Terminato il periodo di trattamento le cellule sono trattate con il probe DCFH-DA secondo quanto descritto in Materiali e Metodi e la fluorescenza emessa analizzata al citofluorimetro. I dati presentati sono relativi ad un esperimento rappresentativo di tre esperimenti indipendenti con risultati simili.

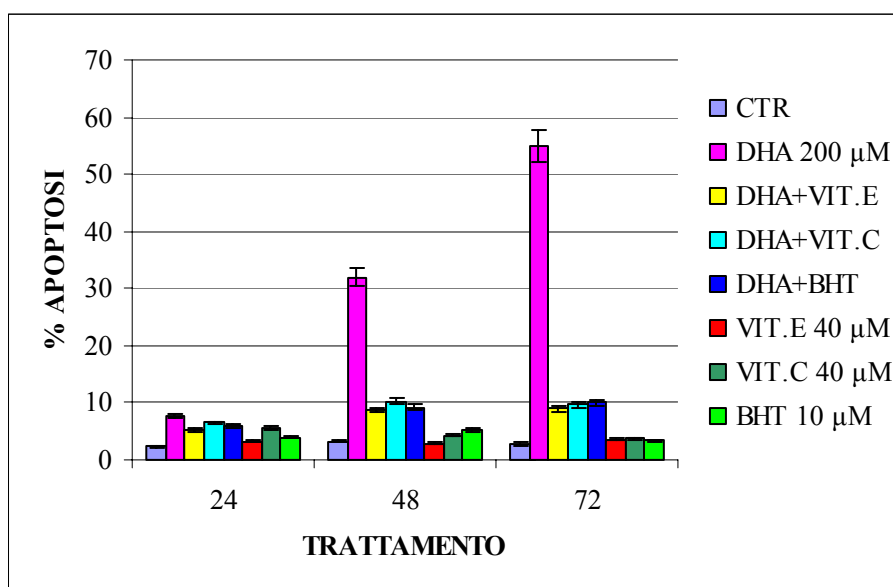


Fig. 7. Effetto dei composti antiossidanti sull'apoptosi indotta da DHA. Le cellule PaCa-44 sono state trattate con DHA 200 µM per 24, 48, 72 ore. Al termine dei periodi di incubazione le cellule sono state staccate e i livelli percentuali di apoptosi sono stati valutati con analisi citofluorimetrica previa colorazione con PI. I dati presentati sono espressi come media $\pm$ SD di tre esperimenti indipendenti.

4.5 Effetto del DHA sulla perossidazione lipidica.

Il coinvolgimento dello stress ossidativo nell'apoptosi DHA-indotta è stato ulteriormente analizzato misurando i valori di malondialdeide (MDA), prodotto della perossidazione dei lipidi di membrana, dopo trattamento con l'acido grasso DHA a diverse concentrazioni di 100, 150 e 200 µM.

I valori di MDA presentano un incremento proporzionale alla concentrazione e al tempo di trattamento, aumentando dopo sole 6 ore di incubazione con l'acido grasso alla concentrazione massima di 200 µM (**Fig. 8**).

I pre-trattamenti con composti antiossidanti, α -tocoferolo (Vitamina E, 40 µM), acido ascorbico (Vitamina C, 40 µM) e BHT (10 µM), riducono i livelli di MDA (**Tabella 3**) indotti dal DHA, utilizzato alla concentrazione più attiva di 200 µM, a sostegno dell'ipotesi di stress ossidativo DHA-indotto.

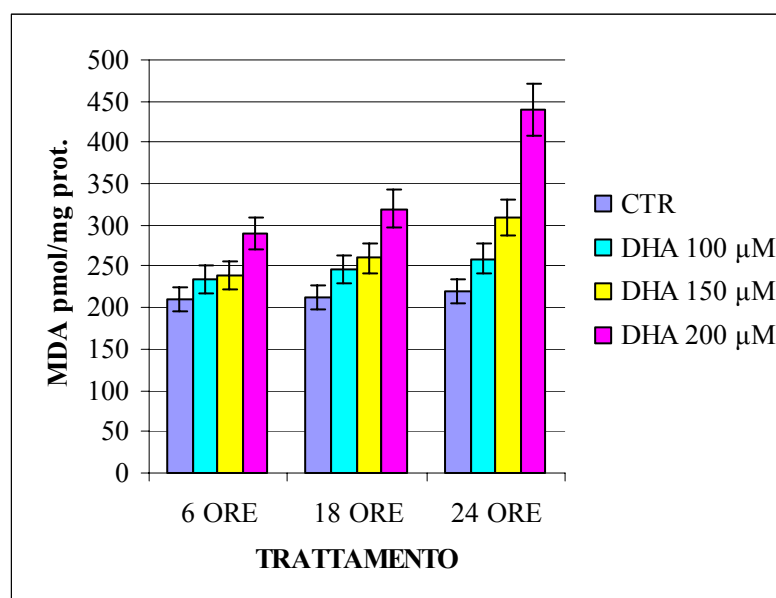


Fig. 8. Effetti del DHA sulla perossidazione lipidica. La linea PaCa-44 trattata con differenti concentrazioni di DHA (100, 150, 200 μ M) per tempi di incubazione di 6,18 e 24 ore, presenta un aumento di MDA proporzionale al tempo di trattamento e alla concentrazione utilizzata. I valori di MDA sono espressi in pmol/mg di proteina. I dati presentati sono espressi come media $\pm$ SD di tre esperimenti indipendenti.

MDA pmol/mg di proteina			
	6 ORE	18 ORE	24 ORE
CTR	211.62	213.6	220.3
DHA 200 μM	293.12	320.3	440.5
DHA + E	274.9	289.4	296.6
DHA +C	265.6	297.8	303.9
DHA + BHT	280.7	286.2	298.1
E 40 μM	185.9	179.8	165.9
C 40 μM	200.45	203.4	210.7
BHT 10 μM	189.7	200.8	178.3

Tab. 3. Effetto degli antiossidanti su MDA indotta da DHA. Gli antiossidanti sono aggiunti con 1 ora di anticipo rispetto al trattamento con DHA (200 μ M). I valori di MDA sono espressi in pmoli/mg di proteina. I dati riportati sono relativi ad un esperimento rappresentativo di tre esperimenti indipendenti con risultati simili.

4.6 La perdita attiva di GSH dal citosol è una condizione per l'apoptosi indotta da DHA.

Poiché è stato riportato che le fasi iniziali dell'attivazione del programma apoptotico precludono l'eliminazione della molecola antiossidante glutatione (GSH) dalla cellula (Ghibelli et al., 1995; Ghibelli et al., 1998; Ghibelli et al., 1999), si è voluto investigare se tale processo fosse implicato anche nell'apoptosi DHA-indotta. A tale scopo le cellule PaCa-44 in coltura sono state trattate con DHA 200 μ M, ed in esse è stata analizzata la concentrazione di glutatione ridotto (GSH) e glutatione ossidato (GSSG) (Neuschwander-Tetri and Roll, 1989) dopo 6, 18 e 24 ore, periodi di trattamento in cui tali cellule attivano il programma di morte come già dimostrato dal test dell'annexina V. Dai dati riportati nella **Tabella 4**, si nota un decremento tempo-dipendente dei livelli intracellulari di GSH già dopo 6 h di trattamento con DHA, mentre la concentrazione di glutatione ossidato, GSSG, non subisce variazioni significative tanto a 6 ore quanto a 18 e 24 ore di trattamento. Per verificare se dietro questa rapida diminuzione dei livelli di GSH si nascondesse un meccanismo di eliminazione attiva di tale molecola antiossidante dalla cellula, è stato esaminato come due specifici inibitori dei trasportatori per il GSH, cistationina (Cys) e metionina (Met), fossero capaci di inibire l'apoptosi DHA-indotta creando così una condizione sperimentale che non permette la perdita di GSH dalla cellula.

Come illustrato dalla **Fig. 9**, il pre-trattamento con 1 ora di anticipo rispetto al DHA 200 μ M della linea cellulare PaCa-44 con 1mM di cistationina o 1mM di metionina, inibisce totalmente l'apoptosi a 48, 72 ore. Una inibizione parziale dell'apoptosi DHA-indotta si nota aggiungendo al medium di coltura con 20 ore di anticipo rispetto al trattamento con DHA 200 μ M, lo stesso GSH ridotto (100 μ M) o il suo precursore, N-acetilcisteina (NAC, 40 μ M).

Questi risultati indicano che, in cellule tumorali di adenocarcinoma pancreatico, la perdita di GSH ridotto, attraverso un meccanismo di

eliminazione mediato da trasportatori, è un presupposto per l'attivazione del programma apoptotico indotto dal DHA.

Tempo di trattamento (ore)	Controllo		DHA 200 μ M	
	GSH	GSSG	GSH	GSSG
	nmol/mg proteina			
6	80.7 $\pm$ 2.6	0.76 $\pm$ 0.1	70.1 $\pm$ 3.1	0.90 $\pm$ 0.09
18	83.14 $\pm$ 3.2	0.93 $\pm$ 0.07	60.2 $\pm$ 3.8	0.83 $\pm$ 0.1
24	79.6 $\pm$ 2.9	0.68 $\pm$ 0.2	42.04 $\pm$ 2.6	0.58 $\pm$ 0.4

Tab. 4. Concentrazione intracellulare di GSH ridotto e GSSG ossidato in cellule PaCa-44 di controllo e cellule trattate con DHA 200 μ M. I dati riportati sono espressi come media $\pm$ SD di tre diversi esperimenti.

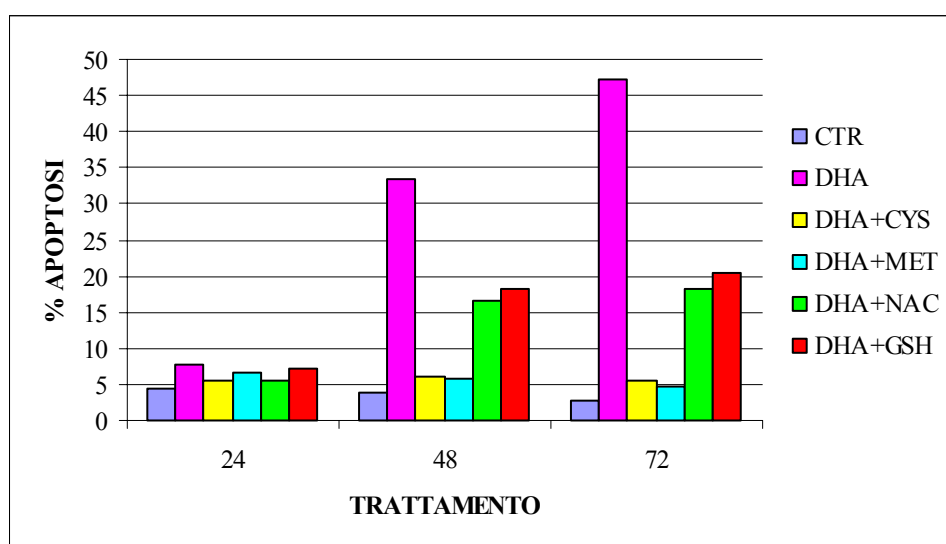


Fig. 9. Effetto degli inibitori dei canali per GSH, del suo precursore NAC e del GSH. Le cellule PaCa-44 in coltura sono pre-trattate con 1 ora di anticipo rispetto al DHA (200 μ M) con 1 mM di metionina o 1 mM cistationina e con 20 ore di anticipo per NAC (40 μ M) e GSH (100 μ M). L'apoptosi è stata misurata per diversi tempi di trattamento di 24, 48 e 72 ore con IP associato ad analisi citofluorimetrica. I dati riportati sono relativi ad un esperimento rappresentativo di 3 esperimenti indipendenti con risultati simili

4.7 La diminuzione dell'attività di GPx è implicata nell'apoptosi DHA-indotta.

L' enzima GPx, sia esso citosolico, di membrana o mitocondriale, è implicato nel mantenimento dello stato redox cellulare regolando la presenza e l'attività di ROS all'interno della cellula. Poiché, come dimostrato, il programma di morte cellulare indotto dal DHA è basato sulla deregolazione dell'equilibrio redox e la creazione di un ambiente preferenzialmente ossidato nel citosol cellulare, si è pensato di analizzare l'attività totale e l'espressione di tale enzima regolatorio. Dalla **Fig. 10.A** si nota un decremento di circa il 40 % nell'attività di GPx totale a seguito di trattamento con DHA 200 μ M dopo 24 ore di incubazione, mentre rimane pressoché invariata dopo 6 e 18 ore. Il decremento di attività non si correla ad una variazione nell'espressione dell'enzima né nella sua porzione citosolica né in quella di membrana che rimangono costanti per tutti i periodi di trattamento (**Fig. 10.B**).

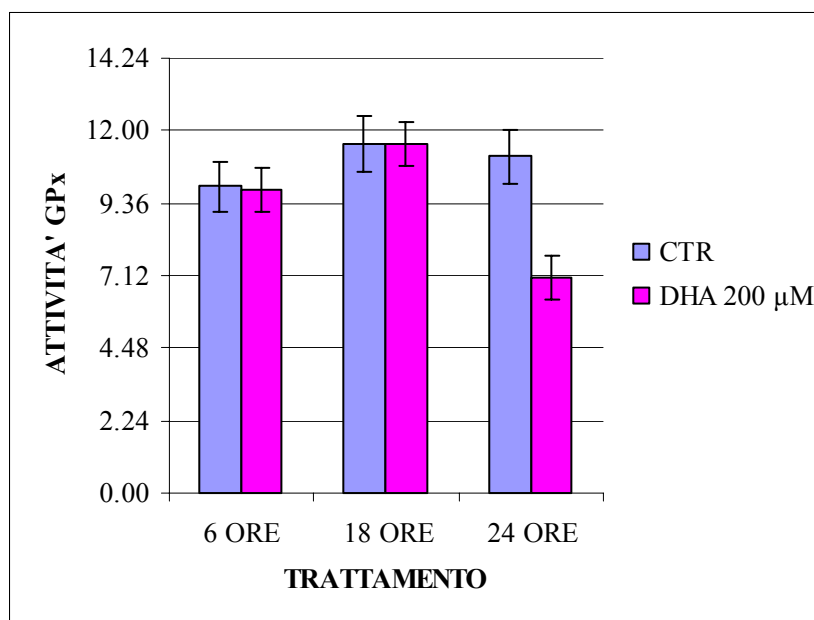


Fig. 10.A

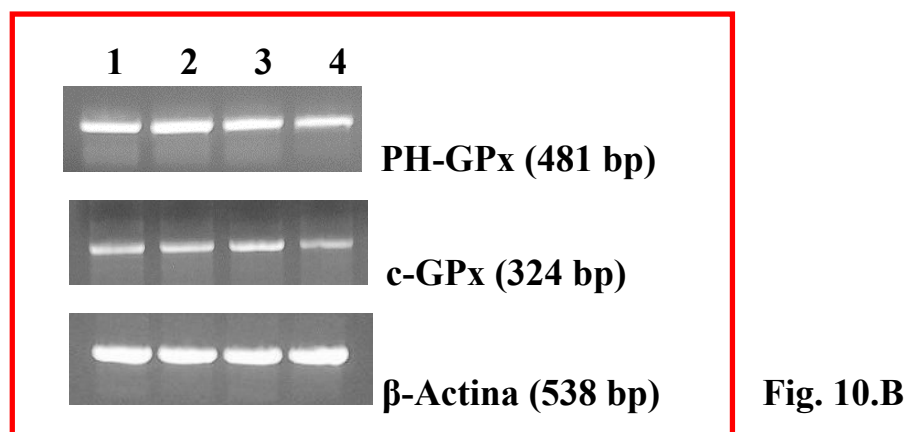


Fig. 10. Coinvolgimento di GPx nell'apoptosi DHA-indotta. (A) Misura dell'attività di GPx totale. Le cellule PaCa-44 sono state incubate con DHA 200 μ M per tempi di trattamento di 6, 18 e 24 ore. Al termine di ciascuna incubazione è stata analizzata l'attività di GPx totale, secondo quanto già descritto in Materiali e Metodi. I valori dell'attività sono espressi in mU/mg di proteina. I risultati sono espressi come media $\pm$ SD di tre esperimenti indipendenti. (B) Espressione di PH-GPx e c-GPx nella linea PaCa-44. Le cellule sono state incubate con DHA 200 μ M per tempi di trattamento di 6, 18 e 24 ore. Al termine di ciascuna incubazione è stato estratto RNA totale e retrotrascritto per l'amplificazione dei geni in PCR secondo quanto già descritto in Materiali e Metodi. Linea 1: controllo; Linea 2: DHA 200 μ M 6 h; Linea 3: DHA 200 μ M 18 h; Linea 4: DHA 200 μ M 24 h. I frammenti amplificati sono stati separati in un gel d'agarosio 1%. L'espressione della β -actina è stata utilizzata come controllo interno per garantire l'integrità di RNA e l'equivalente caricamento degli amplificati in ciascun pozzetto.

Per verificare l'implicazione di GPx nell'apoptosi DHA-indotta si è pensato di pre-trattare la linea cellulare PaCa-44 con selenio. Il selenio è un oligoelemento con la funzione di regolare l'attività di molti enzimi, implicati nel mantenimento dello stato redox nella cellula, tra cui la GPx che, in tutte le sue forme, risulta selenio-dipendente. A tale scopo la linea cellulare PaCa-44 è stata trattata con 20 ore di anticipo rispetto al trattamento con DHA 200 μ M, con Sodio Selenato (Na_2SeO_4) alla concentrazione 1 μ M e per le cellule sono stati di nuovo analizzati alcuni parametri relativi allo stress cellulare (MDA, attività ed espressione di GPx), e le percentuali di apoptosi. Come presentato

nella **Fig.8** il pre-trattamento con selenio riduce ai livelli di controllo la percentuale di cellule apoptotiche inibendo in maniera totale l'apoptosi DHA-indotta (**Fig. 11.A**). L'inibizione dell'apoptosi risulta conseguenza del fatto che l'attività di GPx è aumentata riuscendo a contenere lo stress ossidativo indotto dal trattamento con il DHA (**Fig. 11.B**) infatti, i valori di MDA come prodotto di perossidazione lipidica, sono sensibilmente ridotti nel caso di cotrattamento DHA-selenio (**Fig. 11.C**). Anche la concentrazione di GSH ridotto si mantiene simile al controllo per i co-trattamenti mentre GSSG aumenta a riprova di un incremento di attività per Gpx (**Tabella 5**). L'incremento nell'attività dell'enzima GPx non si correla però con un aumento di espressione né nella porzione citosolica, né in quella di membrana (**Fig. 12**).

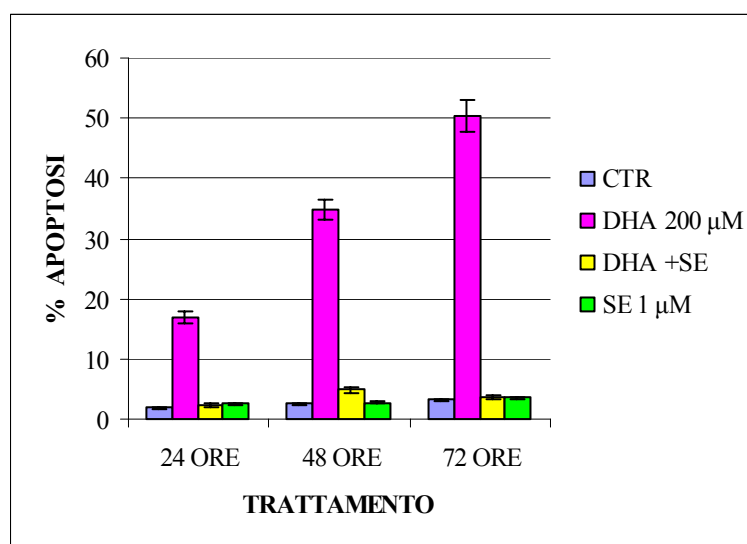


Fig. 11.A

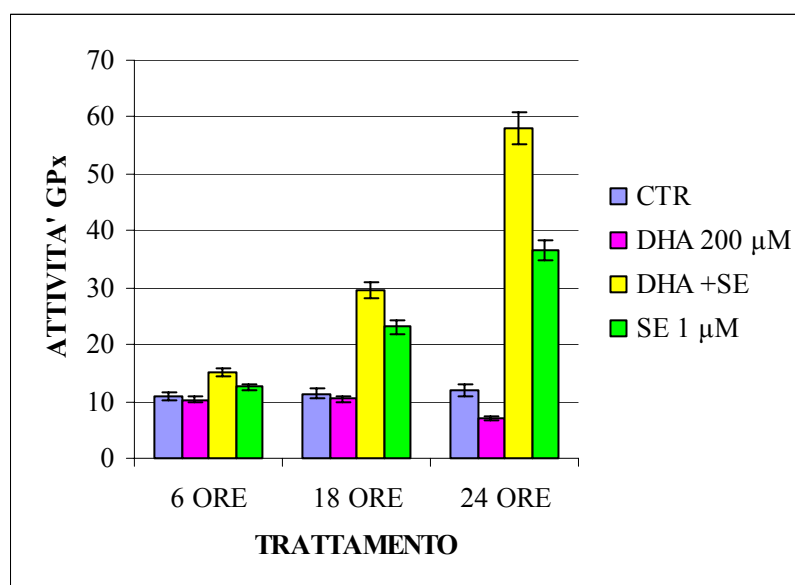


Fig. 11.B

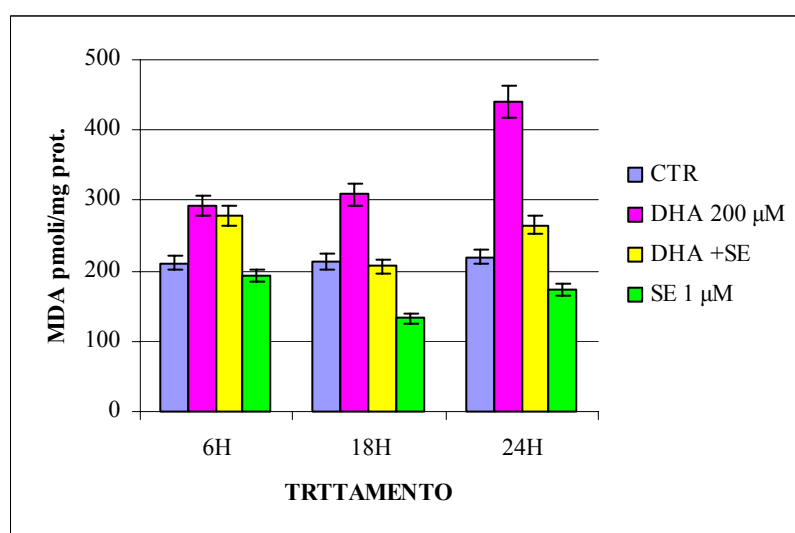


Fig. 11.C

Fig. 11. Effetto del selenio sull'apoptosi DHA-indotta. (A) Analisi citofluorimetrica con PI dell'apoptosi. (B) attività di GPx espressa in mU/mg di proteina. (C) valori di MDA espressi in pmoli/mg di proteina. I dati riportati sono espressi come media $\pm$ SD di 3 esperimenti indipendenti.

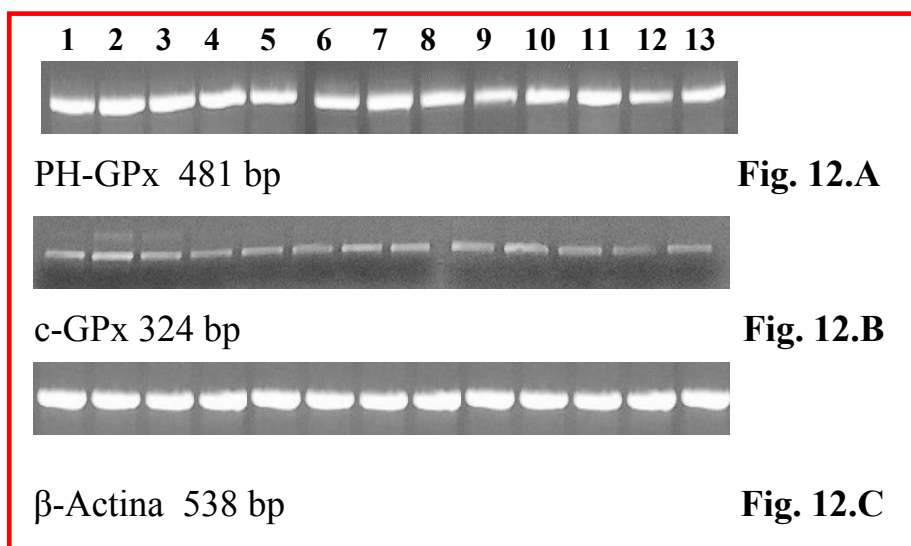


Fig. 12. Effetto del selenio sull'espressione di PH-GPx (A) e c-GPx (B). Le cellule sono state incubate con selenio 1 μ M con 20 ore di anticipo rispetto al trattamento con DHA 200 μ M per tempi di trattamento di 3, 6, 18 e 24 ore. Al termine di ciascuna incubazione è stato estratto RNA totale e retrotrascritto per l'amplificazione dei geni in PCR secondo quanto già descritto in Materiali e Metodi. I frammenti amplificati sono stati separati in un gel d'agarosio 1%. L'espressione della β -actina (C) è stata utilizzata come controllo interno per garantire l'integrità di RNA e l'equivalente caricamento degli amplificati in ciascun pozzetto. Linea 1: controllo; Linea 2: DHA 200 μ M 3 h; Linea 3 DHA 200 μ M + Se 1 μ M 3 h; Linea 4 Se 3 h; Linea 5: DHA 200 μ M 6 h; Linea 6 DHA 200 μ M + Se 1 μ M 6 h; Linea 7 Se 6 h; Linea 8: DHA 200 μ M 18 h; Linea 9 DHA 200 μ M + Se 1 μ M 18 h; Linea 10: Se 18 h; Linea 11: DHA 200 μ M 24 h; Linea 12: DHA 200 μ M + Se 1 μ M 24 h; Linea 13: Se 24 h.

		CTR	DHA	DHA+Se	Se
6 ORE	GSH	80.7 ± 2.6	70.1 ± 3.1	83.1 ± 1.9	100.6 ± 2.1
	GSSG	0.76 ± 0.1	0.80 ± 0.09	0.79 ± 0.1	0.80 ± 0.1
18 ORE	GSH	83.14 ± 3.2	60.2 ± 3.8	88.07 ± 4.7	126.22 ± 4.8
	GSSG	0.93 ± 0.07	0.83 ± 0.1	0.92 ± 0.05	1.0 ± 0.02
24 ORE	GSH	79.6 ± 2.9	42.04 ± 2.6	66.7 ± 3.2	130.9 ± 5.2
	GSSG	0.68 ± 0.2	0.58 ± 0.4	0.96 ± 0.1	1.2 ± 0.03

Tabella 5. Concentrazione intracellulare di GSH ridotto e GSSG ossidato in cellule PaCa-44 di controllo, cellule trattate con DHA 200 µM e cotrattamenti DHA 200 µM + SE 1 µM. I risultati sono riportati come media ± SD di tre diversi esperimenti.

4.8 La vitamina A sensibilizza Paca-44 all'apoptosi DHA-indotta

Come già noto la proliferazione cellulare, il differenziamento e l'apoptosi possono essere regolati dai recettori nucleari PPARs che risultano attivi solo dopo aver eterodimerizzato con i recettori per retinoidi RXRs. Poiché il DHA rappresenta un ligando per i PPARs, si è voluta analizzare la possibilità che l'effetto pro-apoptotico di tale acido grasso fosse strettamente connesso con tali recettori teorizzando una regolazione di geni implicati nell'apoptosi-DHA indotta mediata da PPARs attivati. A tale scopo le cellule Paca-44 sono state piastrate e, successivamente trattate con 1 ora di anticipo rispetto al DHA 200 µM, con at-RA a diverse concentrazioni di 25 e 50 µM, per 3 tempi di incubazione di 24, 48, 72 ore. Al termine dei periodi di incubazione le cellule sono state colorate con una soluzione ipotonica di PI e la loro fluorescenza analizzata al citofluorimetro. Come è possibile notare dalla **Fig. 13**, at-RA, combinato con DHA, è in grado di incrementare i livelli di apoptosi in modo proporzionale sia al suo dosaggio sia al tempo di incubazione, evidenziando la possibilità di una regolazione genica nell'apoptosi DHA-indotta.

Il co-trattamento con la molecola anti-ossidante α -tocoferolo (Vit.E) riduce la percentuale di cellule apoptotiche nei campioni trattati con DHA ed at-RA, ma non ristabilisce i valori a quelli di controllo, evidenziando, nell'apoptosi DHA-indotta, un probabile e contemporaneo coinvolgimento dei due processi, genetico ed ossidativo.

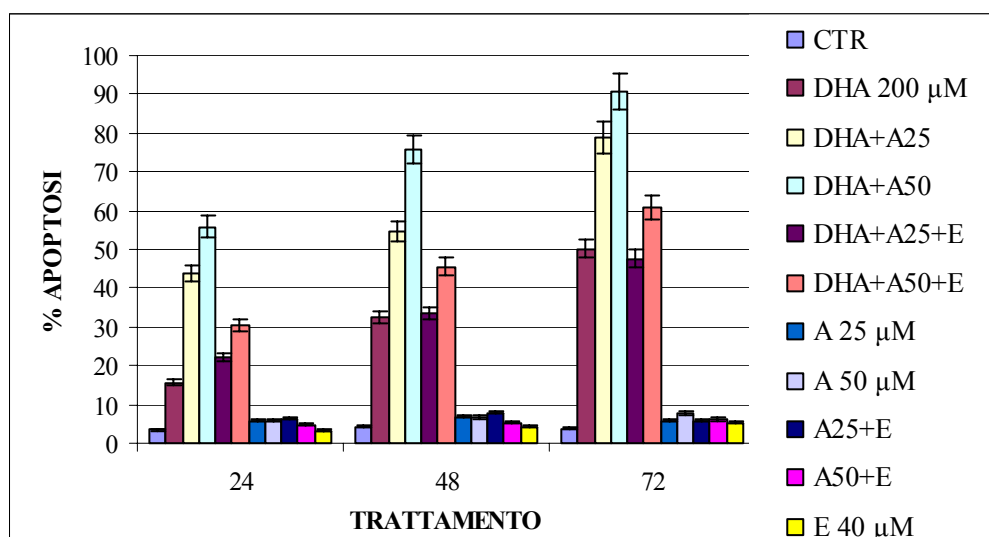


Fig. 13. Analisi dell'apoptosi in cellule PaCa-44 dopo trattamento con DHA, at-RA e Vitamina E. Le cellule sono state trattate con at-RA alla concentrazione 25 e 50 μ M, e con Vitamina E alla concentrazione 40 μ M con 1 ora di anticipo rispetto al DHA 200 μ M per tempi di incubazione di 24, 48, 72 ore. Terminato il periodo di incubazione, le cellule sono state staccate e colorate con una soluzione ipotonica contenente PI e la fluorescenza emessa analizzata al citofluorimetro. Il grafico riporta in percentuale i valori di apoptosi espressi come media $\pm$ SD di tre esperimenti indipendenti.

4.9 L'espressione dei PPARs non varia nell'apoptosi DHA-indotta

Poiché il DHA rappresenta un ligando per tutte le isoforme di PPARs si è voluta analizzare l'espressione e la modulazione dei geni che li codificano nella linea cellulare PaCa-44 in condizioni basali e dopo trattamento con DHA 200 μ M per tempi di incubazione di 3, 6, 18 e 24 ore.

Dalla **Fig. 14** non si notano variazioni dopo il trattamento con l'acido grasso che sembra non influenzare a nessun tempo di incubazione l'espressione di nessuna isoforma dei PPARs.

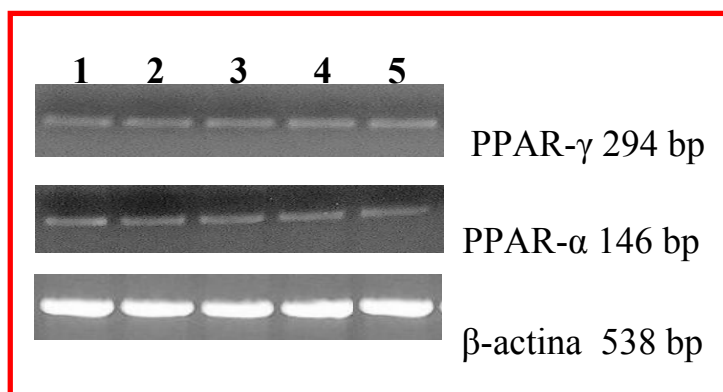


Fig. 14. Espressione delle diverse isoforme di PPARs in PaCa-44. Le cellule sono state incubate con DHA 200 μ M per tempi di trattamento di 3, 6, 18 e 24 ore. Al termine di ciascuna incubazione è stato estratto RNA totale e retrotrascritto per l'amplificazione dei geni in PCR secondo quanto già descritto in Materiali e Metodi. I frammenti amplificati sono stati separati in un gel d'agarosio 1%. L'espressione della β -actina è stata utilizzata come controllo interno per garantire l'integrità di RNA e l'equivalente caricamento degli amplificati in ciascun pozzetto. Linea 1: controllo; Linea 2: DHA 200 μ M 3 h; Linea 3: DHA 200 μ M 6 h; Linea 4: DHA 200 μ M 18 h; Linea 5: DHA 200 μ M 24 h.

4.10 Coinvolgimento di PPAR- γ nell'apoptosi DHA-indotta.

Per dare sostegno all'ipotesi che il DHA possa regolare geneticamente l'apoptosi attraverso i PPARs è stato utilizzato Bhisphenol A Diglycidyl Ether (BADGE), un composto di sintesi conosciuto in letteratura come inibitore specifico ad elevata affinità per l'isoforma γ dei PPARs. Poiché PPAR- γ , una volta attivato dai propri ligandi (ciglitazone, troglitazone, pioglitazone), sembra l'isoforma più capace di regolare l'attivazione del programma apoptotico, si è pensato di analizzare l'effetto di BADGE, ed indirettamente il coinvolgimento di PPAR- γ , nell'apoptosi DHA-indotta. Le cellule PaCa-44 sono state piastrate e successivamente trattate con BADGE alla concentrazione

di 20 μ M con 4 ore di anticipo rispetto al trattamento con DHA 200 μ M. Dopo 24, 48 e 72 ore di trattamento sono state staccate e colorate con una soluzione ipotonica di PI per valutare la percentuale di cellule apoptotiche, analizzando la fluorescenza emessa con un citofluorimetro. Come evidenziato dalla **Fig. 15**, il trattamento con l'inibitore BADGE diminuisce i livelli di apoptosi nelle cellule trattate ma non riporta i valori a quelli del controllo, prova del fatto che PPAR- γ potrebbe essere coinvolto nella morte cellulare indotta dal DHA, ma anche che l'eventuale meccanismo genetico da esso innescato interviene solo in parte nell'apoptosi DHA-indotta.

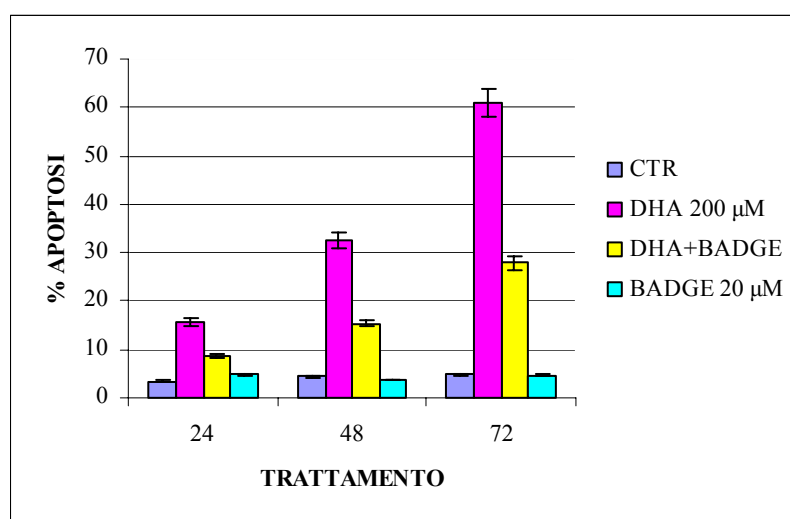


Fig. 15. Analisi dell'apoptosi in cellule Paca-44 dopo trattamento con DHA e BADGE. Il grafico riporta in percentuale i valori di apoptosi espressi come media $\pm$ SD di tre esperimenti indipendenti.

4.11 I geni LOXs sono implicati nell'apoptosi DHA-indotta

Poiché la regolazione genica attraverso i PPARs sembra compenetrare il disequilibrio redox nella regolazione dell'apoptosi DHA-indotta, si è pensato di analizzare la possibile variazione nel pattern espressivo di geni che hanno a che fare con il metabolismo ossidativo degli acidi grassi e con i PPARs quali LOXs e COXs. Tali enzimi hanno infatti, come termine ultimo dei relativi pathways metabolici, la produzione di molecole di segnalazione che presentano

grande affinità per le diverse isoforme dei PPARs. A tale scopo le cellule PaCa-44 sono state piastrate e, successivamente trattate con DHA 200 μ M per 3, 6, 18, 24 ore. Terminati i periodi di incubazione è stato estratto RNA totale e utilizzato per reazioni di RT-PCR come già descritto in Materiali e Metodi. Dalla **Fig. 16** si nota un incremento tempo-dipendente nell'espressione del gene che codifica per 5-LOX, mentre rimane invariata l'espressione della sua proteina attivatrice FLAP (Five-Lipoxygenase Activating Protein). Un aumento d'espressione si nota anche per l'isoforma 15-LOX-2 e 3-LOX, mentre diminuisce la 12-LOX già dopo solo 3 ore di trattamento con DHA. Anche il gene per l'isoforma 15-LOX-1 sembra diminuire la sua espressione mentre quello che codifica per l'enzima COX-2 (forma inducibile), si mantiene costante dopo trattamento con DHA.

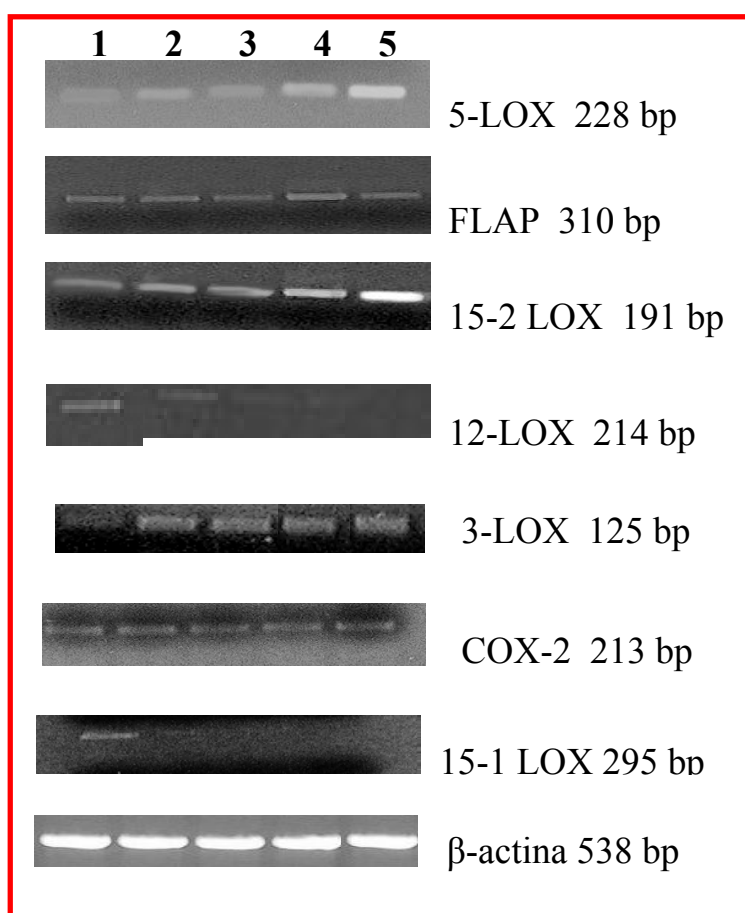


Fig. 16. Modulazione dei geni LOXs e COXs da parte del DHA. Le cellule sono state incubate con DHA 200 μ M per tempi di trattamento di 3, 6, 18 e 24 ore. Al termine di ciascuna incubazione è stato estratto RNA totale e retrotrascritto per l'amplificazione dei geni in PCR secondo quanto già descritto in Materiali e Metodi. I frammenti amplificati sono stati separati in un gel d'agarosio 1%. L'espressione della β -actina è stata utilizzata come controllo interno per garantire l'integrità di RNA e l'equivalente caricamento degli amplificati in ciascun pozzetto.

Linea 1: controllo; Linea 2: DHA 200 μ M 3 h; Linea 3: DHA 200 μ M 6 h; Linea 4: DHA 200 μ M 18 h; Linea 5: DHA 200 μ M 24 h.

4.12 L'inibizione di 5-LOX blocca l'apoptosi DHA-indotta

Per verificare quanto l'enzima 5-LOX fosse implicato nell'apoptosi DHA-indotta, si è pensato di bloccare indirettamente l'attività di questo enzima attraverso l'inibitore specifico per la proteina FLAP, MK886 (3-[1-(*p*-chlorobenzyl)-5-(isopropyl)-3-*tert*-butylthioindol-2-yl]-2,2-dimethylpropanoic acid) (Gillard et al., 1989; Ford-Hutchinson et al., 1994) ed analizzare la variazione dei livelli di apoptosi dopo trattamento con DHA 200 μ M. Come risulta dalla **Fig.17**, le percentuali di apoptosi subiscono un decremento nel caso di cotrattamenti DHA+MK886 che è proporzionale alla concentrazione di MK886 utilizzato, valori pressoché simili a quelli di controllo si hanno per cotrattamenti DHA+MK886 alla concentrazione di 15 μ M per tutti i tempi di incubazione. I campioni con MK886 preso singolarmente non presentano variazione di percentuale di cellule apoptotiche rispetto al controllo per tutte le ore di incubazione.

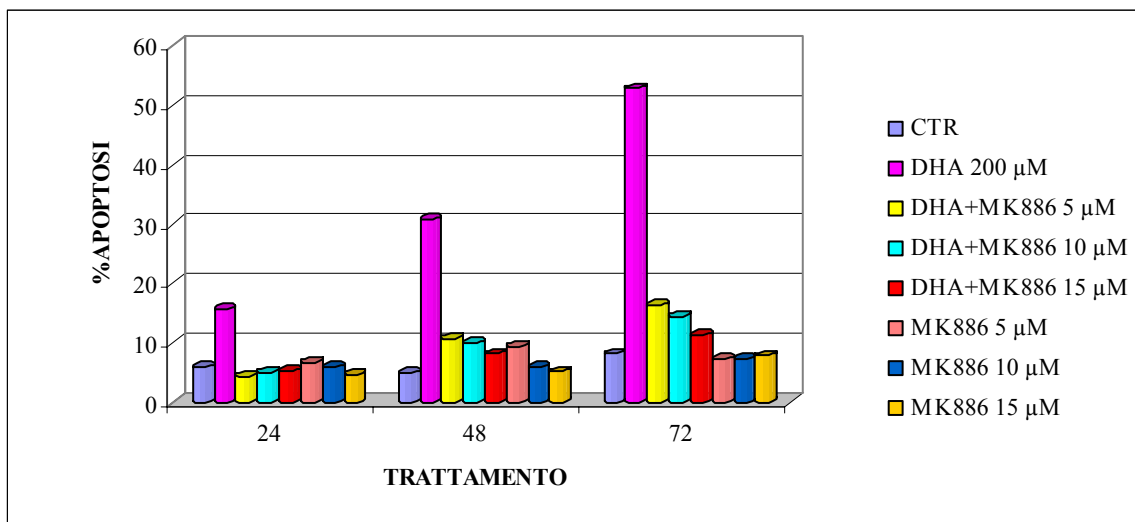


Fig. 17. Analisi dell'apoptosi in cellule PaCa-44 dopo trattamento con DHA e MK886. Le cellule sono state trattate con MK886 alle concentrazioni di 5, 10, 15 μ M con 4 ore di anticipo rispetto al DHA 200 μ M per tempi di incubazione di 24, 48, 72 ore. Terminato il periodo di incubazione, le cellule sono state staccate e colorate con una soluzione ipotonica contenente PI e la fluorescenza emessa analizzata al citofluorimetro. Il grafico riporta in percentuale i valori di apoptosi ottenuti in un esperimento rappresentativo di 3 diversi esperimenti con risultati simili.

§ 5. DISCUSSIONE

Sono sempre più numerosi gli studi che evidenziano la capacità di alcuni acidi grassi, in modo particolare quelli polinsaturi (PUFAs), di inibire la crescita e/o indurre la morte attraverso la via apoptotica in una ampia varietà di cellule tumorali (Kato et al., 2002; Li et al., 2001; Collet et al., 2001; Hawkins et al., 1998; Albino et al., 2000; Rose et al., 1996; Rose et al., 1997). Tuttavia i meccanismi attraverso i quali si esplicano tali funzioni sono ancora incerti e talora contraddittori.

Tra gli acidi grassi PUFAs, l'acido docosaesaenoico (DHA; C22:6, n-3) è quello che, oltre ai ben noti effetti sul sistema cardiovascolare ed immunitario (antiaterogeno, ipotensivo, antidislipidemico, antinfiammatorio) (Harbige, 2003; Cleland et al., 2003; McLennan et al., 1996), manifesta una maggiore capacità regolativa sulla crescita tumorale. Una moltitudine di modelli sperimentali *in vivo* ed *in vitro* dimostrano infatti che il DHA esibisce effetti inibitori sia sulla crescita tumorale sia sull'induzione alla morte cellulare attraverso il processo di apoptosi (Dumbara et al., 2004; Siddiqui et al., 2003; Albino et al., 2000).

Anche se i meccanismi che sono alla base dell'attività regolatoria del DHA, non sono ancora del tutto conosciuti, sono state comunque avanzate principalmente due ipotesi: (i) induzione del programma di morte cellulare programmata conseguente ad una modulazione dello stato redox intracellulare; (ii) regolazione genica diretta o indiretta di geni i cui trascritti intervengono nello svolgimento del processo apoptotico (Larsson et al., 2004).

Lo scopo della ricerca svolta nel periodo di dottorato è stato, quindi, quello di studiare e valutare l'effetto del DHA su linee cellulari tumorali umane e determinare quali fossero gli eventuali meccanismi coinvolti nell'effetto anti-proliferativo e pro-apoptotico di tale acido grasso. In particolare, poiché non esistono tutt'ora lavori scientifici che studiano l'effetto del DHA sull'adenocarcinoma pancreatico umano, uno dei tumori più temuti oltre che

per invasività e decorso rapido anche per una limitata aspettativa di vita dell'individuo malato, è stata utilizzata come modello sperimentale la linea cellulare di adenocarcinoma pancreatico umano PaCa-44.

I primi risultati ottenuti, mostrano che il DHA non solo inibisce la crescita delle cellule tumorali prese in esame (**Fig.1.A**), ma induce apoptosi in modo proporzionale sia al suo dosaggio sia al tempo di incubazione (**Tab.1, 2**). Per valutare la specificità del DHA in relazione alla sua attività biologica, sono stati comparati gli effetti anti-proliferativi e pro-apoptotici di tale acido grasso con quelli sviluppati da altri acidi grassi come il monoinsaturo acido oleico (OA; C18:1, n-9), il diinsaturo acido linoleico (LA; C18:2, n-6) e il saturo a catena corta acido butirrico (BA; C4:0). Dai risultati sperimentali ottenuti, risulta che tali acidi grassi esercitano solo un lieve effetto antiproliferativo senza manifestare alcun effetto pro-apoptotico rispetto al DHA utilizzato alle stesse concentrazioni (**Fig.5.A, B**), dimostrandone quindi la specificità. Questi primi risultati sono, in effetti, in linea con quanto conosciuto in letteratura secondo cui l'azione anti-proliferativa e pro-apoptotica degli acidi grassi sarebbe proporzionale alla lunghezza della catena carboniosa che compone l'acido grasso e alla quantità di doppi legami presenti.

Una volta confermato l'effetto pro-apoptotico del DHA nel nostro modello sperimentale, sono stati effettuati ulteriori studi volti a verificare se la regolazione del programma di morte cellulare programmata fosse mediata da un processo ossidativo e/o un meccanismo genetico.

Essendo il DHA un substrato altamente ossidabile a causa del suo elevato grado di insaturazione, si è voluto valutare la sua influenza su alcuni parametri che regolano lo stato redox intracellulare quali: le specie reattive dell'ossigeno (ROS) e la perossidazione lipidica (MDA), ambedue conosciuti come attivatori del programma apoptotico. L'utilizzo del probe DCFH-DA, sensibile alle variazioni dello stato redox cellulare, ha reso evidente la presenza di un incremento dei livelli di ROS intracellulari (**Fig.6.A**), inoltre il saggio TBARs ha evidenziato l'aumento di MDA intracellulare come risultato del

processo di perossidazione lipidica (**Fig.8**), dimostrando che il trattamento con DHA comporta un disequilibrio dello stato redox intracellulare. Come ulteriore prova di tale coinvolgimento, sono stati analizzati gli effetti di composti con provata attività antiossidante, sia di origine sintetica (BHT) sia naturale (α -tocoferolo [Vit.E], acido ascorbico [Vit.C]) in co-trattamento con DHA. I dati sperimentali relativi a questa prova evidenziano non solo una sensibile riduzione dei livelli di apoptosi con completo annullamento degli effetti di DHA (**Fig.7**), ma anche una diminuzione sia dei livelli di ROS DHA-indotti (**Fig.6.B**) che di MDA (**Tab.3**).

Secondo recenti studi, l'attivazione e lo sviluppo del programma apoptotico sembra essere associato ai livelli di glutathione (GSH), molecola antiossidante intracellulare con la funzione di scavenger di specie radicaliche e cofattore dell'enzima Glutathione Perossidasi (GPx). L'eliminazione attiva del GSH durante le prime fasi del meccanismo apoptotico sembra avere un importante ruolo per il completamento del processo (Filomeni et al., 2002; Ghibelli et al., 1995; Ghibelli et al., 1998; Ghibelli et al., 1999), per questo motivo è stato analizzato il coinvolgimento del GSH nell'apoptosi DHA-indotta.

I risultati ottenuti dal trattamento della linea cellulare PaCa-44 con DHA evidenziano un decremento dei livelli di GSH intracellulare già dopo poche ore di incubazione con l'acido grasso (6 ore) (**Tab.4**), inoltre il trattamento con specifici inibitori dei trasportatori per GSH (Metionina e Cistationina) e con il suo precursore N-acetilcisteina (NAC), annulla l'effetto pro-apoptotico del DHA (**Fig.9**). La perdita di GSH intracellulare sembra, quindi, essere implicato nel processo di apoptosi indotto dal DHA.

La riduzione intracellulare di GSH comporta un decremento delle difese antiossidanti di natura enzimatica all'interno della cellula che si rispecchia nella diminuzione dell'attività dell'enzima glutathione perossidasi (GPx), GSH-e selenio-dipendente, fisiologicamente impegnata nella rimozione del perossido di idrogeno (H_2O_2) e degli idroperossidi degli acidi grassi. I nostri studi mostrano una sensibile riduzione di attività per questo enzima (**Fig.10.A**)

che mantiene però invariata la sua espressione (**Fig.10.B**). Ad ulteriore prova del coinvolgimento di GPx nell'apoptosi indotta da DHA ci sono i dati che evidenziano come, l'aggiunta di Selenio [Sodio Selenato (Na_2SeO_4)] al medium di coltura, non solo ristabilisce la normale funzionalità dell'enzima (**Fig.11.B**), ma inibisce la perossidazione lipidica (MDA) (**Fig.11.C**), l'eliminazione di GSH (**Tab.5**) e l'apoptosi DHA-indotta (**Fig.11.A**).

In linea con quanto finora illustrato, lo stress ossidativo svolge un ruolo di spicco nell'apoptosi DHA-indotta, ma sembra sempre più certa l'idea che tale disequilibrio redox possa essere solamente uno degli elementi che, di concerto, sono coinvolti nella morte cellulare programmata DHA-indotta.

Sono state quindi condotte ulteriori analisi per poter valutare la capacità del DHA di indurre e regolare proliferazione, differenziamento ed apoptosi, attraverso la modulazione dei diversi geni che in tali processi sono impegnati. In questi termini è stata più volte documentata l'affinità di legame dell'acido grasso DHA per i recettori nucleari PPARs che, attraverso eterodimerizzazione con i recettori per retinoidi RXRs/RARs, si legano ai siti responsivi di geni con la funzione di regolare le funzioni cellulari (Willson et al., 2000; Forman et al., 1995). A tal proposito si è voluto: (i) analizzare l'espressione basale dei PPARs nella linea PaCa-44 in esame; (ii) analizzare l'effetto dell'isoforma all-trans dell'acido retinoico (at-RA), come potenziatore di PPARs eventualmente attivati da DHA; (iii) investigare il coinvolgimento di tali recettori nucleari nell'apoptosi DHA-indotta.

Dopo aver verificato attraverso analisi di RT-PCR, la presenza di mRNA per PPAR- α e PPAR- γ , nella linea cellulare PaCa-44 (**Fig.14**), si sono confrontati i livelli di apoptosi relativi ai cotrattamenti DHA+at-RA, rispetto alle incubazioni con DHA preso singolarmente. Dai dati sperimentali si evidenzia un incremento nei valori percentuali di apoptosi che segue una modalità tempo e dose dipendente (**Fig.13**), dimostrando una sensibilizzazione delle cellule all'azione dell'acido grasso i cui effetti sembrano potenziati dall'acido retinoico. Inoltre il cotrattamento DHA+at-RA con molecole antiossidanti

quali α -tocoferolo (Vit.E) diminuisce sensibilmente i valori percentuali di apoptosi senza annullare completamente l'effetto del DHA (**Fig.13**). Infine la diminuzione dei livelli apoptotici, senza l'annullamento dell'effetto del DHA, a seguito di co-trattamento DHA+BADGE (**Fig.15**), citato in letteratura come antagonista per PPAR- γ , suggerisce come i PPARs, ma in modo particolare proprio il PPAR- γ , esercitino un ruolo di primaria importanza nel meccanismo di morte innescato dal DHA e permette di dare sostegno all'ipotesi che il DHA possa regolare anche geneticamente l'apoptosi attraverso l'attivazione di geni implicati nella morte cellulare programmata. Poiché il trattamento con DHA a differenti tempi di incubazione non sembra influenzare l'espressione dei geni PPARs che resta invariata (**Fig.14**), è stato ipotizzato che il coinvolgimento di tali recettori nucleari nell'apoptosi DHA-indotta fosse associato alla loro capacità di modulare e regolare l'attivazione di geni coinvolti nella proliferazione e/o nell'arresto della crescita delle cellule tumorali.

Possibili geni che potrebbero essere coinvolti (direttamente e/o indirettamente) nel processo di apoptosi DHA-indotto, sono quelli che codificano per gli enzimi LOXs e COXs. Dopo aver verificato l'assenza della regolazione genica da parte del DHA su quest'ultima classe di enzimi, ed in modo particolare sulla forma inducibile COX-2 (**Fig.16**), è stata analizzata in tal senso l'espressione degli enzimi LOXs. Il fatto che tali enzimi siano deputati al metabolismo degli acidi grassi, che la loro attività sia fortemente influenzata dallo stato redox cellulare a causa della presenza di un gruppo eme nel loro sito attivo e che la loro espressione possa essere regolata dai PPARs attivati, li rende potenzialmente implicati in tale processo. Infatti, il disequilibrio redox instaurato dal DHA e l'attivazione dei PPARs da parte dello stesso acido grasso, sono fattori che potrebbero modulare non solo l'attività enzimatica delle LOXs ma anche la loro espressione. A tal proposito si è voluto valutare l'effetto del DHA sull'espressione di tali enzimi nella linea cellulare PaCa-44 utilizzando analisi di RT-PCR. I dati sperimentali evidenziano la presenza di mRNA per le diverse sottoclassi LOXs in condizioni basali, 12-LOX, 15-LOX-

1, 15-LOX-2, 5-LOX, sembra invece assente l'enzima 3-LOX le cui funzioni restano da definire (**Fig.16**). Il trattamento con DHA, già dopo un breve periodo di incubazione (3 ore) diminuisce l'espressione dell'enzima 12-LOX, conosciuto in letteratura come anti-apoptotico e stimolante la proliferazione oltre che l'effetto metastatico di un tumore (Matsuyama et al., 2004; Yoshimura et al., 2004; Tong et al., 2002).

L'enzima 5-LOX, al contrario, presenta un incremento tempo-dipendente del suo mRNA dopo trattamento con DHA. Tale incremento, peraltro massimo dopo 24 ore di trattamento, sembra partecipare attivamente al meccanismo di apoptosi DHA-indotta. Infatti, il co-trattamento della linea cellulare PaCa-44 con l'inibitore MK886, specifico per FLAP (Five-Lipoxygenase Activating Factor, coattivatore di 5-LOX), e l'acido grasso DHA, ha fatto registrare una diminuzione significativa dei livelli di apoptosi facendo supporre che l'over-espressione della 5-LOX sia uno dei meccanismi attraverso cui si definisce l'apoptosi DHA-indotta (**Fig.17**). Una probabile spiegazione di tale comportamento è data dalla competizione che il DHA esibisce nei confronti dell'Acido Arachidonico (AA; C20:4, n-6) nei riguardi degli enzimi metabolici comuni LOXs, per i quali risultano substrati elettivi. La maggiore concentrazione di DHA nell'ambiente intracellulare, comporta uno spostamento dell'attività di tali enzimi metabolici sul poliinsaturo della serie n-3 a dispetto di AA. Il risultato di questa competizione ha come conseguenza la produzione di eicosanoidi di diversa natura (LTs della classe 5 e acidi idrossieicosapentaenoici [HEPEs]) derivanti dal DHA, per i quali è stata dimostrata una azione antinfiammatoria ed è in via di sperimentazione l'analisi della funzione pro-apoptotica, rispetto agli effetti opposti mediati dai prodotti del metabolismo di AA.

In questo lavoro sono state, inoltre, valutate le variazioni di espressione delle due isoforme 15-LOX-2 e 15-LOX-1, le cui funzioni sono ancora da definire. In letteratura sono comunque presenti numerosi lavori che attestano una attività anti-apoptotica per il primo enzima e pro-apoptotica per il secondo (Kelavkar

et al., 2001; Nie et al., 2001; Vanderhoek et al., 1980; Vanderhoek et al., 1985). In linea con quanto definito da altri ricercatori, i risultati evidenziano un decremento nell'espressione della forma anti-apoptotica 15-LOX-1 contro un incremento tempo-dipendente della forma pro-apoptotica 15-LOX-2 a seguito di trattamento con DHA (**Fig.16**).

È stata valutata inoltre la variazione di espressione dell'enzima LOX-3, per il quale non si hanno informazioni esaurienti e certe riguardo le sue funzioni cellulari, dopo trattamento con DHA. L'analisi di RT-PCR ha rivelato un incremento dell'espressione di tale enzima dopo sole 3 ore di incubazione (**Fig.16**). Sono in via di studio gli eventuali coinvolgimenti di tale enzima nell'apoptosi DHA-indotta.

In riferimento a quanto finora dimostrato, l'acido grasso DHA manifesta un effetto anti-proliferativo e pro-apoptotico sulla linea cellulare presa in esame, i meccanismi che mediano tale azione sono sia di tipo genetico che ossidativo ed ambedue sono ugualmente coinvolti nei processi di regolazione mediati dal DHA. In questi termini, il DHA potrebbe rivelarsi uno dei nuovi protagonisti nella ricerca contro l'adenocarcinoma pancreatico o più in generale contro le malattie cancerose e sfruttando la sua dualità come induttore di morte cellulare programmata e regolatore della crescita tumorale, potrebbe risultare utile nella messa a punto di nuove cure anti-tumore o come coadiuvante nei trattamenti radio- e chemioterapici classici.

§ 6. BIBLIOGRAFIA

Adams, Cory. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*. 1998;281(5381):1322-6.

Adams, Lawson, Sanigorski, Sinclair. Arachidonic acid to eicosapentaenoic acid ratio in blood correlates positively with clinical symptoms of depression. *Lipids* 1996; 31 Suppl: S157-61.

Albino, Juan, Traganos, Reinhart, Connolly, Rose and Darzynkiewicz. Cell cycle arrest and apoptosis of melanoma cells by Docosahexaenoic Acid: association with decreased pRb phosphorylation. *Cancer Research* 2000; 60, 4139-4145.

Alessandri, Guesnet, Vancassel, Astorg, Denis, Langelier, Aid, Poumes-Ballihaut, Champeil-Potokar, Lavialle. Polyunsaturated fatty acids in the central nervous system: evolution of concepts and nutritional implications throughout life. *Reprod Nutr Dev*. 2004;44(6):509-38

Anderson. Developmental sensitivity of the brain to dietary *n*-3 fatty acids. *J Lipid Res* 1994; 35:105-11.

Andrianifahanana, Moniaux, Schmied, Ringel, Friess, Hollingsworth, Buechler, Aubert and Batra. Mucin (MUC) gene expression in human pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a potential role of MUC4 as a tumor marker of diagnostic significance. *Clin Cancer Res* 2001, 7:4033-4040

Antonsson, Montessuit, Lauper, Eskes, Martinou. Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. **Biochem J** 2000; 345 (Pt 2): 271-8.

Arrington, Chapkin, Switzer, Morriss & McMurray. Dietary polyunsaturated fatty acids modulate purified murine T-cell subset activation. **Clinical and Experimental Immunology** 2001; 125, 499–507.

Aust, Eveleigh. Mechanisms of DNA oxidation. **Proc Soc Exp Biol Med.** 1999;222(3):246-52.

Avis, Hong, Martinez, Moody, Choi, Trepel, Das, Jett and Mulshine. Five-lipoxygenase inhibitors can mediate apoptosis in human breast cancer cell lines through complex eicosanoid interactions¹. **FASEB Journal** 2001;15:2007-2009 .

Avis, Martinez, Tauler, Zudaire, Mayburd, Abu-Ghazaleh, Ondrey, and Mulshine. Inhibitors of the arachidonic acid pathway and peroxisome proliferator-activated receptor ligands have superadditive effects on lung cancer growth inhibition. **CancerRes.**2005;65(10):4181-90.

Azzi, Breyer, Feher, et al. Specific cellular responses to α -tocopherol. **J Nutr** 2000, 130, 1649–1652.

Babior, Kipnes, Curnutte. Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. **J Clin Invest** 1973;52(3):741-4.

Bang, Dyerberg, Hjoorne. The composition of food consumed by Greenland Eskimos. *Acta Med Scand.* 1976;200 (1-2):69-73.

Boudreau, Sohn, Rhee, Lee, Hunt, Hwang. Suppression of tumor cell growth both in nude mice and in culture by n-3 polyunsaturated fatty acids: mediation through cyclooxygenase-independent pathways. *Cancer Res* 2001; 61:1386-91.

Baghurst, McMichael, Slavotinek, et al. A case-control study of diet and cancer of the pancreas. *Am J Epidemiol* 1991;134:167-79.

Bakkevold, Kambestad. Morbidity and mortality after radical and palliative pancreatic cancer surgery. Risk factors influencing the short-term results. *Ann Surg.* 1993;217(4):356-68.

Bansal, Sonnenberg. Pancreatitis is a risk factor for pancreatic cancer. *Gastroenterology* 1995;109:247-51.

Beecher. Phytonutrients' role in metabolism: effects on resistance to degenerative processes. *Nutr Rev* 1999, 57, S3-S6.

Bernardi, Scorrano, Colonna, Petronilli, Di Lisa. Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issue. *Eur J Biochem* 1999; 264 (3): 687-701.

Bertrand, Solary, O'Connor, Kohn, Pommier. Induction of a common pathway of apoptosis by staurosporine. *Exp Cell Res.* 1994;211(2):314-21.

Beutner, Ruck, Riede, Brdiczka. Complexes between porin, hexokinases, mitochondrial creatine kinase and adenylate translocator display properties of the

permeability transition pore. Implication for regulation of permeability transition by the kinases. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1368 (1): 7-18.

Billiar, Bankey, Svingen, Curran, West, Holman, Simmons and Cerra. Fatty acid uptake and kupffer cell function: fish oil alters eicosanoid and monokine production to endotoxin stimulation. *Surgery* 1988; 104, 343–349.

Bittiner, Cartwright, Tucker, Bleehe. A double-blind randomised placebo-controlled trial of fish oil in psoriasis. *Lancet* 1988;1:378–80.

Blok, Deslypere, Demacker, Van der Ven- Jongekrijg, Hectors, Van der Meer and Katan. Pro- and anti-inflammatory cytokines in healthy volunteers fed various doses of fish oil for 1 year. *European Journal of Clinical Investigation* 1997; 27, 1003–1008.

Bold, Termuhlen, Mc Conkey. Apoptosis, cancer and cancer therapy. *Surg Oncol* 1997, 6 (3): 133-42

Boyle, Ferlay. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann. Oncol.* 2005 Mar;16(3):481-8. Epub 2005 Feb 17.

Brash. Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J. Biol. Chem.* 1999; 274:23679-23682.

Buchler, Friess, Schultheiss, Gebhardt, Kubel, Muhrer, Winkelmann, Wagener, Klapdor, Kaul, et al. A randomized controlled trial of adjuvant immunotherapy (murine monoclonal antibody 494/32) in resectable pancreatic cancer. *Cancer.* 1991 Oct 1;68(7):1507-12.

Burger, Krieg, Kinzig, Schurich, Marks, and Furstenberger. Constitutive expression of 8-lipoxygenase in papillomas and clastogenic effects of

lipoxygenase-derived arachidonic acid metabolites in keratinocytes. *Mol. Carcinog.* 1999, 24: 108–117.

Calviello, Di Nicuolo, Serini, Piccioni, Boninsegna, Maggiano, Ranelletti, Palozza. Docosahexaenoic acid enhances the susceptibility of human colorectal cancer cells to 5-fluorouracil. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2005;55(1):12-20.

Cannon, Fiatarone, Meydani, Gong, Scott, Blimberg and Evans. Aging and dietary modulation of elastase and interleukin-1 beta secretion. *American Journal of Physiology* 1995; 268, R208–R213.

Cao, Maitra, Saavedra, Klimstra, Adsay, Hruban. Expression of novel markers of pancreatic ductal adeno-carcinoma in pancreatic nonductal neoplasm: additional evidence of different genetic pathways. *Mod Pathol* 2005; 18(6):752-61.

Casey, Lipoxygenases. In: Shewry, P. R.; Casey, R., eds. *Seed proteins*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer; 1999:685–708.

Caughey, Mantzioris, Gibson, Cleland and James. The effect on human tumour necrosis factor α and interleukin-1 β production of diets enriched in n-3 fatty acids from vegetable oil or fish oil. *American Journal of Clinical Nutrition* 1996; 63, 116–122.

Chen and Istfan. Docosahexaenoic acid is a potent inducer of apoptosis in HT-29 colon cancer cells. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acid* 2000, 63 (5): 301-308.

Chen, Capdevila, Raymond, Harris. Cytochrome P450 Epoxygenase Metabolism of Arachidonic Acid Inhibits Apoptosis. *Molecular and Cell Biology* 2001; 21 (18), 6322-6331.

Choi, Mason. Folate and carcinogenesis: an integrated scheme. *J Nutr* 2000, 130, 129–132.

Chiu, Wong, Ooi. Docosahexaenoic acid from a cultured microalga inhibits cell growth and induces apoptosis by upregulating Bax/Bcl-2 ratio in human breast carcinoma MCF-7 cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1030:361-8.

Clark, Bishop-Bailey, Estrada-Hernandez, Hla, Puddington, Padula. The nuclear receptor PPAR gamma and immunoregulation: PPAR gamma mediates inhibition of helper T cell responses. *J Immunol.* 2000;164(3):1364-71.

Cleland, James, et al. The role of fish oils in the treatment of rheumatoid arthritis. *Drugs* 2003; 63(9): 845-53.

Cohen, Duke, Fadok, Sellins. Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu Rev Immunol* 1992;10:267-93.

Colin, Reggers, et al. Lipids, depression and suicide. *Encephale* 2003 ; 29(1): 49-58.

Collett, Davidson, Fan, Lupton, Chapkin. n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids differentially modulate oncogenic Ras activation in colonocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001;280(5):C1066-75

Cooper, Gibbons, Horan, Little and Rothwell. Effect of dietary fish oil supplementation on fever and cytokine production in human volunteers. *Clinical Nutrition* 1993; 12, 321–328.

Cory and Adams. The Bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2002; 2 (9): 647-56.

Daynes and Jones. Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. *Nature Reviews, Immunology* 2002; 2: 748-759.

Damianaki, Bakogeorgou, Kampa, et al. Potent inhibitory action of red wine polyphenols on human breast cancer cells. *J Cell Biochem* 2000, 78, 429–441.

Danbara, Yuri, Tsujita-Kyutoku, Sato, Senzaki, Takada, Hada, Miyazawa, Okazaki, Tsubura. Conjugated docosahexaenoic acid is a potent inducer of cell cycle arrest and apoptosis and inhibits growth of Colo 201 human colon cancer cells. *Nutr Cancer* 2004;50(1):71-9.

Das, Madhavi, Sravan Kumar, Padma, Sangeetha. Can tumour cell drug resistance be reversed by essential fatty acids and their metabolites? *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 1998; 58 (1): 39-54.

Day, DiGiuseppe, Yeo, Lai-Goldman, Anderson, Goodman, Kern and Hruban. Immunohistochemical evaluation of HER-2/neu expression in pancreatic adeno-carcinoma and pancreatic intraepithelial neoplasms. *Hum Pathol* 1996, 27:119-24.

Datta, Biswal, Kehrer. The 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP) inhibitor, MK886, induces apoptosis independently of FLAP. *Biochem J.* 1999;340 (Pt2):371-5.

De Lorgeril, Salen. Alpha-linolenic acid and coronary heart disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2004;14(3):162-9.

Denault and Salvesen. Caspase: keys in the ignition of cell death. *Chem Rev* 2002; 102 (12): 4489-500.

Devesa, Blot, Stone, Miller, Tarone, Fraumeni. Recent cancer trends in the United States. *J Natl Cancer Inst.* 1995;87(3):175-82.

Dyerberg, Bang, Stoffersen, Moncada, Vane. Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis? *Lancet.* 1978;2(8081):117-9.

Eibl, Wente, Reber, Hines. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces pancreatic cancer cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 287: 522–29.

Ekoé, Ghadirian, Simard, et al. Diabetes mellitus and pancreatic cancer: a case-control study in Greater Montreal, Quebec, Canada. *Rev Epidemiol Santé Publique* 1992;40:447–53 (in French).

Elnemr, Ohta, Iwata, et al. PPARgamma ligand (thiazolidinedione) induces growth arrest and differentiation markers of human pancreatic cancer cells. *Int J Oncol* 2000; 17: 1157–64.

Elstner, Muller, Koshizuka, et al. Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor γ and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BXH mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:8806–11.

Evans, Lee, Leach, Fuhrman, Cusack, Rich. Vascular resection and intraoperative radiation therapy during pancreaticoduodenectomy: rationale and technique. 1996; *Adv Surg.* 1996;29:235-62.

Filomeni, Rotilio, Ciriolo. Cell signalling and the glutathione redox system. *Biochem Pharmacol* 2002; 64: 1057-1064.

Fleischhacker. New developments in the pharmacotherapy of schizophrenia. *J Neural Transm Suppl* 2003; 64: 105-17.

Flohè and Gunzler. Assay of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology* 1984; 105:114-121.

Floyd. The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1990; 11:1447–1450.

Ford-Hutchinson, Gresser, and Young. 5-Lipoxygenase. *Annu. Rev. Biochem* 1994; 63: 383–417.

Forman, Tontonoz, Chen, et al. 15-Deoxy-delta 12, 14- prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte-determination factor PPAR gamma. *Cell* 1995; 83: 803–12.

Freedman, Clifford, Messina. Analysis of dietary fat, calories, body weight, and the development of mammary tumors in rats and mice: a review. *Cancer Res* 1990; 50: 5710-5719.

Gallai, Sarchielli, Trequattrini, Franceschini, Floridi, Firenze, Alberti, Di Benedetto and Stragliotto. Cytokine secretion and eicosanoid production in the peripheral blood mononuclear cells of MS patients undergoing dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids. *Journal of Neuroimmunology* 1993;56, 143–153.

Gamet-Payrastre, Li, Lumeau, et al. Sulforaphane, a naturally occurring isothiocyanate, induces cell cycle arrest and apoptosis in HT29 human colon cancer cells. *Cancer Res* 2000, 60, 1426–1433.

Ganther. Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis* 1999, 20, 1657–1666.

Ghadirian, Baillargeon, Simard, Perret. Food habits and pancreatic cancer: a case-control study of the Francophone community in Montreal, Canada. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 1995;4:895–9.

Ghadirian, Simard, Baillargeon, et al. Nutritional factors and pancreatic cancer in the Francophone community in Montreal, Canada. *Int J Cancer* 1991;47:1–6.

Ghadirian, Thouez, PetitClerc. International comparisons of nutrition and mortality from pancreatic cancer. *Cancer Detect Prev* 1991;15:357–62.

Ghadirian, Lynch, Krewski. Epidemiology of pancreatic cancer: an overview. *Cancer Detection and Prevention* 2003; 27:87-93.

Ghibelli, Coppola, Fanelli, Rotilio, Civitareale, Scovassi, Ciriolo. Glutathione depletion causes cytochrome c release even in the absent of cell commitment to apoptosis. *FASEB J.* 1999; 13: 2031-2036.

Ghibelli, Coppola, Rotilio, Lafavia, Maresca, Ciriolo. Non-oxidative loss of glutathione in apoptosis via GSH extrusion. *Biochem Biophys Res Comm* 1995; 216: 313-320.

Ghibelli, Fanelli, Rotilio, Lafavia, Coppola, Colussi, Civitareale, Ciriolo. Rescue of cells from apoptosis by inhibition of active GSH extrusion. *FASEB J.* 1998; 12: 479-486.

Gillard, Ford-Hutchinson, Charleson, Denis, Foster, Fortin, Leger, McFarlane, Morton, Piechuta, Riendeau, Rouzer, Rokach, Young, MacIntyre, Peterson, Bach, Eiermann, Hopple, Humes, Hupe, Luell, Metzger, Meurer, Miller, Opas, and Pacholok. L-663,536 (MK-886) (3-[1-(4-chlorobenzyl)-3-*t*-butyl-thio-5-isopropylindol-2-yl]-2,2-dimethylpropanoic acid), a novel, orally active leukotriene biosynthesis inhibitor. *Can. J. Physiol. Pharmacol* 1989; 67: 456–464.

Goggins, Hruban and Kern. BRCA2 is inactivated late in the development of pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence and implications. *Am J Pathol* 2000, 156:1767-1771

Golstein, Ojcius, Young. Cell death mechanisms and the immune system. *Immunol Rev* 1991; 121: 29-65

Grant. Dietary links to Alzheimer's disease. *Alz Dis Rev* 1997; 2: 42-55.

Grechkin. Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway. *Prog. Lipid Res.* 1998; 37:317–352.

Green, Reed. Mitochondria and apoptosis. *Science.* 1998;281(5381):1309-12.

Greenwald, Clifford, Milner. Diet and cancer prevention. *European Journal of Cancer* 2001; 37: 948-65

Grimminger, Mayser, Papavassilis, Thomas, Schlotzer, Heuer, Fuhrer, Hinsch, Walmrath, Schill. A double-blind, randomized, placebo-controlled trial of n-3 fatty acid based lipid infusion in acute, extended guttate psoriasis. Rapid improvement of clinical manifestations and changes in neutrophil leukotriene profile. *Clin. Invest.* 1993; 71, 634–643.

Grommes, Landreht, Heneka. Antineoplastic effects of PPAR- γ agonists. *Lancet Oncology* 2004; 5: 429-429.

Gudjonsson. Cancer of the pancreas. 50 years of surgery. *Cancer.* 1987;60(9):2284-303.

Gullo, Pezzilli, Morselli-Labate. Diabetes and the risk of pancreatic cancer. Italian Pancreatic Cancer Study Group. *New Engl J Med* 1994;331:81–4.

Halliwel. The antioxidant paradox. *Lancet* 2000, 355, 1179–1180.

Hamberg, Samuelsson. Prostaglandin endoperoxides. Novel transformations of arachidonic acid in human platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1974;71:3400-3404.

Harbige. Fatty acids, the immune response, and autoimmunity: a question of n-6 essentiality and the balance between n-6 and n-3. *Lipids* 2003;38(4):323-41.

Harris, Park, et al.. Cardiovascular disease and long-chain omega-3 fatty acids. *Curr Opin Lipidol* 2003; 14(1): 9-14.

Hawkins, Sangster, Arends. Apoptotic death of pancreatic cancer cells induced by polyunsaturated fatty acids varies with double bond number and involves an oxidative mechanism. *J Pathol.* 1998;185(1):61-70.

Hawthorne AB, Daneshmend TK, Hawkey CJ, et al. Treatment of ulcerative colitis with fish oil supplementation: a prospective 12-month randomized controlled trial. *Gut* 1992;33:922–8.

Hibbeln JR, Salem N Jr. Dietary polyunsaturated fatty acids and depression: When cholesterol does not satisfy. *Am J Clin Nutr* 1995; 62: 1-9.

Hill, E. M., Eling, T., and Nettesheim, P. Changes in expression of 15-lipoxygenase and prostaglandin-H synthase during differentiation of human tracheobronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;18(5):662-9.

Hino A, Adachi H, Toyomasu K, Yoshida N, Enomoto M, Hiratsuka A, Hirai Y, Satoh A, Imaizumi T. Very long chain N-3 fatty acids intake and carotid atherosclerosis: an epidemiological study evaluated by ultrasonography. *Atherosclerosis* 2004;176(1):145-9.

Hoernlein, R. F., Orlikowsky, T., Zehrer, C., Niethammer, D., Sailer, E. R., Simmet, T., Dannecker, G. E., and Ammon, H. P. Acetyl-11-keto- β -boswellic acid induces apoptosis in HL-60 and CCRF-CEM cells and inhibits topoisomerase I. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1999; 288: 613–619.

Holben DH, Smith AM. The diverse role of selenium within selenoproteins: a review. *J Am Diet Assoc* 1999, 99, 836–843.

Hoque, Lippman, Wu, Xu, Liang, Swisher, Zhang, Cao, Ajani, Xu. Increased 5-lipoxygenase expression and induction of apoptosis by its inhibitors in esophageal cancer: a potential target for prevention. *Carcinogenesis* 2005;26(4):785-91.

Horrocks and Yeo. Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). *Pharmacological Research* 1999; Vol. 40, No. 3.

Howe, Ghadirian, Bueno de Mesquita, et al. A collaborative case-control study of nutrient intake and pancreatic cancer within the SEARCH program. *Int J Cancer* 1992;51:365–72.

Hruban, van Mansfeld, Offerhaus, van Weering, Allison, Goodman, Kensler, Bose, Cameron and Bos. K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. A study of 82 carcinomas using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization. *Am J Pathol* 1993, 143:545-54

Hua, Zhang, Hu, Jia. Loss of DPC4 expression and its correlation with clinicopathological parameters in pancreatic carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9 (12): 2764-7.

IARC Working Group on the Evaluation of Cancer Preventive Agents. *IARC Handbooks of Cancer Prevention*, Volume 2: Carotenoids. Lyon, France, International Agency for Research on Cancer (IARC), 1998, 1–326.

Innis SM. The 1993 Borden Award Lecture. Fatty acid requirements of the newborn. *Can J Physiol Pharmacol* 1994; 72: 148-92.

Itami, Watanabe, Shimada, Hashimoto, Kawamura, Kato, Hosotani and Imamura. Ligands for PPAR- γ inhibit growth of pancreatic cancers both in vitro and in vivo. *Inter J Cancer* 2001; 94: 370-376.

Jeffery NM, Yaqoob P, Newsholme EA & Calder PC. The effects of olive oil upon rat serum lipid levels and lymphocyte functions are due to oleic acid. *Annals of Nutrition and Metabolism* 1996; 40, 71–80.

Jiang, Chen, Card, Yang, Chen, Fu, Ning, Xiao, Zeldin and Wang. Cytochrome P450 2J2 Promotes the Neoplastic Phenotype of Carcinoma Cells and Is Up-regulated in Human Tumors. *Cancer Research* 2005; 65, 4707-4715.

Jiao HL, Zhao BL. Cytotoxic effect of peroxisome proliferator fenofibrate on human HepG2 hepatoma cell line and relevant mechanisms. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2002;185(3):172-9.

Jolly CA, Jiang Y-H, Chapkin RS & McMurray DN. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids suppress murine lymphoproliferation, interleukin-2 secretion and the formation of diacylglycerol and ceramide. *Journal of Nutrition* 1997; 127, 37–43.

Kamitani, Geller, and Eling. Expression of 15-lipoxygenase by human by human colorectal carcinoma Caco-2 cells during apoptosis and cell differentiation. *J Biol Chem.* 1998;273(34):21569-77.

Karlson BM, Ekblom A, Josefsson S, et al. The risk of pancreatic cancer following pancreatitis: an association due to confounding? *Gastroenterology* 1997;113:587–92.

Karmali, Marsh, Fuchs. Effect of omega-3 fatty acids on growth of a rat mammary tumor. *J Natl Cancer Inst* 1984; 73: 457-61

Kato T, Hancock RL, Mohammadpour H, McGregor B, Manalo P, Khaiboullina S, Hall MR, Pardini L, Pardini RS. Influence of omega-3 fatty

acids on the growth of human colon carcinoma in nude mice. *Cancer Lett.* 2002;187(1-2):169-77.

Kelavkar, Nixon, Cohen, Dillehay, Eling, Badr: Overexpression of 15-lipoxygenase-1 in PC-3 human prostate cancer cells increases tumorigenesis. *Carcinogenesis* 2001; 22: 1765–1773.

Kerr, Wyllie and Currie. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue Kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26 (4) :239-57

Key, Allen, Spencer, Travis. The effect of diet on risk of cancer. *Lancet* 2002; 360: 861-68.

Kinzig, Heidt, Fürstenberger, Marks & Krieg. cDNA cloning, genomic structure, and chromosomal localization of a novel murine epidermis-type lipoxygenase. *Genomics* 1999; 58: 158–164.

Knowles LM, Milner JA. Diallyl disulfide inhibits p34cdc2 kinase activity through changes in complex formation and phosphorylation. *Carcinogenesis* 2000, 21, 1129–1134.

Kremer, J.M., Lawrence, D.A., Jubiz, W., DiGiacomo, R., Rynes, R., Bartholomew, L.E., Sherman, M.. Dietary fish oil and olive oil supplementation in patients with rheumatoid arthritis. Clinical and immunologic effects. *Arthritis Rheum.* 1990; 33, 810–820.

Krieg, Marks & Fürstenberger. A gene cluster encoding human epidermis-type lipoxygenases at chromosome 17p13.1: cloning, physical mapping, and expression. *Genomics* 2001; 73: 323–300.

Kroemer and Reed. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 2000; 6 (5): 513-9.

Kroemer, Dallaporta, Resche-Rigon. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol.* 1998;60:619-42.

Kroemer, Zamzami and Susin. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 1997; 18 (1): 44-51.

Kuhn, Thiele. The diversity of the lipoxygenase family. Many sequence data but little information on biological significance. *FEBS Lett.* 1999; 449:7–11.

Kushi, Giovannucci. Dietary Fat and Cancer. *Am J Med.* 2002; 113 (9B): 63S–70S.

Kyprianou, English, Isaacs. Activation of a Ca^{2+} - Mg^{2+} -dependent endonuclease as an early event in castration-induced prostatic cell death. *Prostate.* 1988;13(2):103-17.

Larsson, Kumlin, Ingelman-Sundberg and Wolk. Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. *Am J Clin Nutr* 2004;79:935– 45.

Leist, Single, Castoldi, Kuhnle, Nicotera. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med.* 1997;185(8):1481-6.

Lemberger, Desvergne and Wahli. Peroxisome proliferator-activated Receptors: A signaling pathway in lipid physiology. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.*

1996;12:335-363.

Li, Luo, Wang. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 2001; 412 (6842): 95-9.

Li,Qiao, Reynaud, Abdelhaleem, Pace-Asciak. The hepoxilin analog, PBT-3, inhibits growth of K-562 CML solid tumours in vivo in nude mice. *In Vivo*. 2005;19(1):185-9.

Lillemoe, Yeo, Cameron. Pancreatic cancer: state-of-the-art care. *CA Cancer J Clin*. 2000;50(4):241-68. Review

Lindner. A fish oil diet inhibits colon cancer in mice. *Nutr Cancer* 1991;15:1-11.

Liu, Bibus, Bode, Ma, Holman, Dong. Omega 3 but not omega 6 fatty acids inhibit AP-1 activity and cell transformation in JB6 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(13):7510-5

Loeffler and Kroemer. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cell Res* 2000; 256 (1): 19-26.

Lorenz, Weber, Szimmau, et al. Supplementation with n-3 fatty acids from fish oil in chronic inflammatory bowel disease: a randomized placebo-controlled, double blind cross-over trial. *J Intern Med* 1989;225(Suppl 1):225–32.

Lossing, Best, McGregor, et al. A Canadian study of smoking and health. Ottawa (Canada): Department of National Health and Welfare; 1986.

Lowenfels, Maisonneuve, Cavallini, et al. Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer: International Pancreatitis Study Group. *New Engl J Med* 1993;328:1433–7.

Lynch, Nawaz, Gerschenson. Evidence for soluble factors regulating cell death and cell proliferation in primary cultures of rabbit endometrial cells grown on collagen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(13):4784-8.

Majno, Joris. Apoptosis, oncosis and necrosis: an overview of cell death. *Am J Pathol* 1995; 146:3-15

Marchetti, Decaudin, Macho, Zamzami, Hirsch, Susin, Kroemer. Redox regulation of apoptosis: impact of thiol oxidation status of mitochondrial function. *Eur J Immunol* 1997; 27 (1): 289-96.

Matsuyama, Yoshimura, Mitsunashi, Tsuchida, Takemoto, Kawahito, Sano, Nakatani. 5-Lipoxygenase inhibitors attenuate growth of human renal cell carcinoma and induce apoptosis through arachidonic acid pathway. *Oncol Rep*. 2005;14(1):73-9.

Matsuyama, Yoshimura, Mitsunashi, Hase, Tsuchida, Takemoto, Kawahito, Sano, Nakatani. Expression of lipoxygenase in human prostate cancer and growth reduction by its inhibitors. *Int J Oncol*. 2004;24(4):821-7.

Matsuyama, Yoshimura, Tsuchida, Takemoto, Segawa, Shinnka, Kawahito, Sano and Nakatani. Lipoxygenase inhibitors prevent urological cancer cell growth. *Int J Mol Medicine* 2004; 13: 665-668.

McCord, Fridovich. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.* 1969; 244(22):6049-55.

McCowen, Bistrian. Essential fatty acids and their derivatives *Curr Opin Gastroenterol.* 2005;21(2):207-15.

McLennan, Howe, Abeywardena, Muggli, Raederstorff, Mano, Rayner, Head. The cardiovascular protective role of docosahexaenoic acid. *Eur. J. Pharmacol.* 1996; 300, 83–89.

Meade and Mertin. Fatty acids and immunity. *Advances in Lipid Research* 1978; 16, 127–165.

Meier, Finch, Evan. Apoptosis in development. *Nature* 2000; 407: 796-801.

Meng, Goldberg, Rosen, Fan. Inhibitory effects of Indole-3-carbinol on invasion and migration in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2000, 63, 147–152.

Meydani, Endres, Woods, Goldin, Soo, Morrill-Labrode, Dinarello and Gorbach. Oral n-3 fatty acid supplementation suppresses cytokine production and lymphocyte proliferation: comparison between young and older women. *Journal of Nutrition* 1991; 121, 547–555.

Mo, Elson. Apoptosis and cell-cycle arrest in human and murine tumor cells are initiated by isoprenoids. *J Nutr* 1999, 129, 804–813.

Molvig, Pociot, Worsaae, Wogensen, Baek & Christensen. Dietary supplementation with omega-3 polyunsaturated fatty acids decreases mononuclear cell proliferation and interleukin 1b content, but not monokine

secretion in healthy and insulin-dependent diabetic individuals. *Scandinavian Journal of Immunology* 1991; 34, 399–410.

Morris, Evans, Bienias, Tangney, Bennett, Wilson, Aggarwal, Schneider. Consumption of fish and n-3 fatty acids and risk of incident Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2003;60(7):940-6.

Motomura, Okumura, Takahashi, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by troglitazone inhibits cell growth through the increase of p27Kip1 in human pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res* 2000; 60: 5558–64.

Muga, Thuillier, Pavone, Rundhaug, Boeglin, Jisaka, Brash, and Fischer. 8S-lipoxygenase products activate peroxisome proliferator-activated receptor alpha and induce differentiation in murine keratinocytes. *Cell Growth Differ.* 2000; 11 (8): 447-454.

Nagata. Fas-mediated apoptosis. *Adv Exp Med Biol.* 1996;406:119-24.

Naismith, Sprang. Modularity in the TNF-receptor family. *Trends Biochem Sci.* 1998 Feb;23(2):74-9.

Narayanan, Narayanan, Reddy. Docosahexaenoic acid regulated genes and transcription factors inducing apoptosis in human colon cancer cells. *Int J Oncol* 2001; 19:1255-62.

Naruse, Keino. Apoptosis in the developing CNS. *Prog Neurobiol.* 1995;47(2):135-155.

Nelson, Koymans, Kamataki, Stegeman, Feyereisen, Waxman, Waterman, Gotoh, Coon, Estabrook, Gunsalus, Nebert. P450 superfamily: update on new

sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 1996; 6: 1- 42.

Nicoletti, Migliorati, Pagliacci, Grignani and Riccardi. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 1991; 139: 271-279.

Nie, Che, Grignon, Tang and Honn. Role of eicosanoids in prostate cancer progression. *Cancer and Metastasis Reviews* 2001; 20: 195–206.

Nomura, Ma, Chen, Bode, Dong. Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced NF-kB activation by tea polyphenols, epigallocatechin gallate and theaflavins. *Carcinogenesis* 2000; 21: 1885–1890.

Ogino, Packer, Traber. Oxidant stress and host oxidant defense mechanisms. In Heber D, Blackburn GL, Go VLW, eds. *Nutritional Oncology*. New York, Academic Press, 1999, 253–275.

Panigrahy, Singer, Shen, et al. PPARgamma ligands inhibit primary-tumor growth and metastasis by inhibiting angiogenesis. *J Clin Invest* 2002; **110**: 923–32.

Pantalone, Pelo, Minuti, Giotti et al. p53 and DPC4 alterations in the bile of patients with pancreatic carcinoma. *J Surg Oncol* 2004; 88 (4): 210-6.

Papazisis, Zambouli, Kimoundri, et al. Protein tyrosine kinase inhibitor, genistein, enhances apoptosis and cell cycle arrest in K562 cells treated with irradiation. *Cancer Lett* 2000, 160, 107–113.

Parviz Pour, Krishan K Pandey, Surinder K Batra. What is the origin of pancreatic adenocarcinoma? *Molecular Cancer* 2003, 2:13.

Pinto, Rivlin. Garlic and other allium vegetables in cancer prevention. In Heber D, Blackburn GL, Go VLW, eds. *Nutritional Oncology*. New York, Academic Press, 1999.

Platz, Giovannucci. Vitamin D and calcium in colorectal and prostate cancers. In Heber D, Blackburn GL, Go VLW, eds. *Nutritional Oncology*. San Diego, Academic Press, 1999, 223–252.

Qiao, Lam, Reynaud, Abdelhaleem, Pace-Asciak. The hepoxilin analog PBT-3 induces apoptosis in BCR-ABL-positive K562 leukemia cells. *Anticancer Res*. 2003;23(5A):3617-22.

Renier, Skamene, De Sanctis and Radzioch. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids prevent the development of atherosclerotic lesions in mice: modulation of macrophage secretory activities. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 1993; 13, 1515–1524.

Richter, Kass. Oxidative stress in mitochondria: its relationship to cellular Ca²⁺ homeostasis, cell death, proliferation, and differentiation. *Chem Biol Interact*. 1991;77(1):1-23.

Roberts, James, Woodyatt, Macdonald, Tugwood. Evidence for the suppression of apoptosis by the peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPAR- α). *Carcinogenesis* 1998;19:43–8.

Romano and Claria. Cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase converging functions on cell proliferation and tumor angiogenesis: implications for cancer therapy. *FASEB J*. 2003; 17, 1986–1995.

Rose and Connolly. Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. *Pharmacology & Therapeutics* 1999, 83: 217-244.

Rose, Connolly, Meschter. Effect of dietary fat on human breast cancer growth and lung metastasis in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 1991;83:1491-5

Rose and Connolly. Dietary fat and breast cancer metastasis by human tumor xenografts. *Breast Cancer Res Treat* 1997;46, 225–237.

Rose, Connolly and Coleman. Effect of omega-3 fatty acids on the progression of metastases after the surgical excision of human breast cancer cell solid tumors growing in nude mice. *Clin Cancer Res* 1996; 2, 1751–1756.

Rozenblum, Schutte, Goggins, Hahn, Panzer, Zahurak, Goodman, Sohn, Hruban, Yeo and Kern. Tumor suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 1997, 57:1731-174.

Sai, Kanno, Hasegawa, Trosko, Inoue. Prevention of the down-regulation of gap junctional intercellular communication by green tea in the liver of mice fed pentachlorophenol. *Carcinogenesis* 2000, 21, 1671–1676.

Sakamoto. Synergistic effects of thearubigin and genistein on human prostate tumor cell (PC-3) growth via cell cycle arrest. *Cancer Lett* 2000, 151, 103–109.

Salem, Kim, Yergey. Docosahexaenoic acid: membrane function and metabolism. In: Simopolous, A.P., Kifer, R.R., Martin, R.E. (Eds.), *Health Effects of Polyunsaturated Fatty Acids in Seafoods* Academic Press, New York, 1986, pp. 319–351.

Salti, Grewal, Mehta, Das Gupta, Boddie, Constantinou. Genistein induces apoptosis and topoisomerase II-mediated DNA breakage in colon cancer cells. *Eur J Cancer* 2000, 36, 796–802.

Salvesen and Renatus. Apoptosome: the seven-spoked death machine. *Dev Cell* 2002b; 45 (3):528-37.

Sanderson P, Yaqoob P & Calder PC Effects of dietary lipid manipulation upon rat spleen lymphocyte functions and expression of cell surface molecules. *Journal of Nutritional and Environmental Medicine* 1995a; 5, 119–132.

Sandstrom, Pardi, Tebbey, Dudek, Terrian, Folks and Buttke. Lipid hydroperoxide-induced apoptosis: lack of inhibition by Bcl-2 over-expression. *FEBS Lett.* 1995;365(1):66-70.

Scaffidi, Fulda, Srinivasan, Friesen, Li, Tomaselli, Debatin, Krammer and Peter. Two CD95 (APO-1/Fas) signalling pathways. *EMBO J* 1998, 17:1675-1687

Scheithauer, Funovics, Mueller, Ludwig. Sequential high-dose methotrexate, 5-fluorouracil, and doxorubicin for treatment of advanced pancreatic cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1990;116(2):132-3.

Scheleger, Verbeke, Hildebrand, Zentgraf, Bleyl. c-Myc activation in primary and metastatic ductal adenocarcinoma of the pancreas: incidence, mechanism, and clinical significance. *Mod Pathol* 2002; 15 (4): 462-9

Schmidt, Arnesen, De Caterina, Rasmussen, Kristensen. Marine n-3 polyunsaturated fatty acids and coronary heart disease. Part I. Background,

epidemiology, animal data, effects on risk factors and safety. *Thromb Res.* 2005;115(3):163-70.

Schmidt, Varming, Moller, Bulow Pederson, Madsen, Dyerberg. No effect of a very low dose of n-3 fatty acids on monocyte function in healthy humans. *Scandinavian Journal of Clinical Investigation* 1996; 56, 87–92.

Schniewind, Christgen, Kurdow, Haye, Kremer, Kalthoff, Ungefroren. Resistance of pancreatic cancer to gemcitabine treatment is dependent on mitochondria-mediated apoptosis. *Int J Cancer.* 2004;109(2):182-8.

Schut, Yao. Tea as a potential chemopreventive agent in PhIP carcinogenesis: effects of green tea and black tea on PhIP–DNA adduct formation in female F-344 rats. *Nutr Cancer* 2000, 36, 52–58.

Seki, Tsuji, Hayato, Moritomo, Ariga. Garlic and onion oils inhibit proliferation and induce differentiation of HL-60 cells. *Cancer Lett* 2000, 160, 29–35.

Shahidi, Miraliakbari. Omega-3 (n-3) fatty acids in health and disease: Part 1--cardiovascular disease and cancer. *J Med Food* 2004 Winter;7(4):387-401.

Shappell, Gupta, Manning, Whitehead, Boeglin, Schneider, Case, Price, Jack, Wheeler, Matusik, Brash, and DuBois. 15S-Hydroxyeicosatetraenoic Acid Activates Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ and Inhibits Proliferation in PC3 Prostate Carcinoma Cells. *Cancer Research* 2001; 61: 497–503.

Shimada, Kojima, Yoshiura, Hiraishi, Terano. Characteristics of the

peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) ligand induced apoptosis in colon cancer cells. *Gut* 2002;50:658–64.

Shureiqi, Chen, Lee, Yang, Newman, Brenner, Lotan, Fischer and Lippman. 15-LOX-1: a novel molecular target of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced apoptosis in colorectal cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92(14):1136-42.

Shureiqi, Wojno, Poore, Reddy, Moussalli, Spindler, Greenson JK, Normolle D, Hasan AA, Lawrence TS, Brenner DE. Decreased 13-S-hydroxyoctadecadienoic acid levels and 15-lipoxygenase-1 expression in human colon cancers. *Carcinogenesis* 1999;20(10):1985-95.

Shureiqi, Xu, Chen, Lotan, Morris, Fischer, and Lippman. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs induce apoptosis in esophageal cancer cells by restoring 15-lipoxygenase-1 expression. *Cancer Res.* 2001;61(12):4879-84.

Shureiqi I, Chen D, Lotan R, Yang P, Newman RA, Fischer SM, Lippman SM. 15-Lipoxygenase-1 mediates nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced apoptosis independently of cyclooxygenase-2 in colon cancer cells. *Cancer Res.* 2000;60(24):6846-50.

Siddiqui, Jenski, Harvey, Wiesehan, Stillwell, Zaloga. Cell-cycle arrest in Jurkat leukaemic cells: a possible role for docosahexaenoic acid. *Biochem J.* 2003;371(Pt2):621-9.

Stillwell, Jenski, Crump, Ehringer. Effect of docosahexaenoic acid on mouse mitochondrial membrane properties. *Lipids* 1997;32, 497-506.

Strasser, Puthalakath, Bouillet, Huang, O'Connor, O'Reilly, Cullen, Cory, Adams. The role of bim, a proapoptotic BH3-only member of the Bcl-2 family in cell-death control. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;917:541-8.

Strasser, O'Connor and Dixit. Apoptosis signalling. *Annu Rev Biochem* 2000; 69:217-45.

Susin, Lorenzo, Zampami, Marzo, Snow et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999; 397 (6718):441-6.

Swartz, Batra, Varshney, Hollingsworth, Yeo, Cameron, Wilentz, Hruban and Argani. MUC4 Expression increases progressively in pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) *Am J Clin Pathol* 2002, 117:791-796

Tahin, Blum, Carafoli. The fatty acid composition of subcellular membranes of rat liver, heart, and brain: diet-induced modifications. *Eur. J. Biochem.* 1981, 121, 5–13.

Thies, Nebe-von-Caron, Powell, Yaqoob, Newsholme and Calder. Dietary supplementation with eicosapentaenoic acid, but not with other long-chain n-3 or n-6 polyunsaturated fatty acids, decreases natural killer cell activity in healthy subjects aged >55 y. *American Journal of Clinical Nutrition* 2001a; 73, 539–548.

Thies, Nebe-von-Caron, Powell, Yaqoob, Newsholme and Calder. Dietary supplementation with linolenic acid or fish oil decreases T lymphocyte proliferation in healthy older humans. *Journal of Nutrition* 2001b; 131, 1918–1927.

Toyoda, Takagi, Horiguchi, et al. A ligand for peroxisome proliferator activated receptor gamma inhibits cell growth and induces apoptosis in human liver cancer cells. ***Gut*** 2002;50:563–7.

Toyota, Miyazaki, Kitamura, et al. Peroxisome proliferatoractivated receptor gamma reduces the growth rate of pancreatic cells through the reduction of cyclin D1. ***Life Sci*** 2002; 70: 1565–75.

Tong, Ding, Adrian. The mechanisms of lipoxygenase inhibitor-induced apoptosis in human breast cancer cells. ***Biochem Biophys Res Commun.*** 2002; 296(4):942-8.

Tsai, Nagawa, Kaizaki, Tsuruo, Muto. Inhibitory effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on sigmoid colon cancer transformants. ***J Gastroenterology*** 1998;33:206-12

Tsubouchi, Sano, Kawahito, et al. Inhibition of human lung cancer cell growth by the peroxisome proliferatoractivated receptor- γ agonists through induction of apoptosis. ***Biochem Biophys Res Commun*** 2002;270:400–5.

Tsujimoto and Shimizu. Bcl-2 regulation by the Bcl-2 family proteins. ***Cell Death Differ*** 2000; 7 (12): 1174-81.

Van Poppel, Van den Berg. Vitamins and cancer. ***Cancer Letters*** 1997, 114, 195-202.

Vanderhoek, Bryant, and Bailey. Inhibition of leukotriene biosynthesis by the leukocyte product 15-hydroxy-5,8,11,13-eicosatetraenoic acid. ***J Biol Chem.*** 1980;255(21):10064-6.

Vanderhoek, Karmin, and Ekborg. Endogenous hydroxyeicosatetraenoic acids stimulate the human polymorphonuclear leukocyte 15-lipoxygenase pathway. *J. Biol. Chem.*, 260: 15482–15487, 1985.

Vazquez, Silvestre, Prous. Experimental approaches to study PPAR-gamma agonists as antidiabetic drugs. **Methods Find Exp Clin Pharmacol** 2002, 24(8):515-523.

Verhagen, Ekert, Pakusch, Silke, Connolly, Moritz, Simpson and Vaux. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 2000; 102 (1): 43-53.

Wahli. PPARs: from metabolic control to epidermal wound healing. *Swiss Med Wkly* 2002, 132: 83-91.

Wakita, Ohyanagi, Yamamoto, Tokuhisa, Saitoh. Overexpression of c-Ki-Ras and c-fos in human pancreatic carcinomas. *Int J Pancreatol* 1992; 11 (1): 43-7

Wallace, Miles and Calder. Activation state alters the effect of dietary lipids on proinflammatory mediator production by murine macrophages. *Cytokine* 2000a; 12, 1374–1379.

Wallace, Miles, Evans, Stock, Yaqoob and Calder. Dietary fatty acids influence the production of Th1- but not Th2-type cytokines. *Journal of Leukocyte Biology* 2001; 69, 449–457.

Wang, Lin-Shiau, Lin. Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells. *Eur J Cancer* 1999, 35, 1517–1525.

Wang. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Gene Dev* 2001; 15 (22): 2922-33.

Welsch. Relationship between dietary fat and experimental mammary tumorigenesis: a review and critique. *Cancer Res.* 1992;52(suppl 7):2040S–2048S.

Wenzel, Kuntz, Brendel, Daniel. Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer Res* 2000, 60, 3823–3831.

Westphal and Kalthoff. Apoptosis: Targets in Pancreatic Cancer. *Molecular Cancer* 2003, 2 (6).

Wilentz, Iacobuzio-Donahue, Argani, McCarthy, Parsons, Yeo, Kern, Hruban. Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression. *Cancer Res.* 2000;60(7):2002-6.

Willson, Brown, Sternbach, Henke. The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *J Med Chem* 2000; 43: 527–50.

Wingo, Ries, Giovino, Miller, Rosenberg, Shopland, Thun, Edwards. Annual report to the nation on the status of cancer, 1973-1996, with a special section on lung cancer and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst.* 1999;91(8):675-90.

World Cancer Research Fund. Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: A Global Perspective. Washington, DC, *American Institute for Cancer Research*, 1997.

Wyllie, Kerr, Currie. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.* 1980;68:251-306.

Xia, Wang, Kang. Decreased n-6/n-3 fatty acid ratio reduces the invasive potential of human lung cancer cells by downregulation of cell adhesion/invasion-related genes. *Carcinogenesis* 2005; 26 (4):779-784.

Xu, Duncan, Wangen, Kurzer. Soy consumption alters endogenous estrogen metabolism in postmenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000, 9, 781–786.

Xu, Furukawa, Kanai, Sunamura, Horii. Abrogation of DUSP6 by hypermethylation in human pancreatic cancer. *Hum Genet* 2005; 50 (4): 159-67.

Yang, Korsmeyer. Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood* 1996; 88 (2): 386-401.

Yang, Zhang, Xin, Shi, Wu, Guo, Guan. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ ligands induce cell cycle arrest and apoptosis in human renal carcinoma cell lines. *Acta Pharmacologica Sinica* 2005; 26 (6): 753–761

Yao, Sistilli, Van Kammen. Membrane polyunsaturated fatty acids and CSF cytokines in patients with schizophrenia. *Prostaglandins Leukot Essent. Fatty Acids.* 2003;69(6):429-36.

Yaqoob and Calder. Effects of dietary lipid manipulation upon inflammatory mediator production by murine macrophages. *Cellular Immunology* 1995a; 163, 120–128.

Yaqoob and Calder. The effects of dietary lipid manipulation on the production of murine T-cell-derived cytokines. *Cytokine* 1995b; 7, 548–553.

Yaqoob, Newsholme and Calder. Inhibition of natural killer cell activity by dietary lipids. *Immunology Letters* 1994b; 41, 241–247.

Yaqoob, Newsholme and Calder. The effect of dietary lipid manipulation on rat lymphocyte subsets and proliferation. *Immunology* 1994a; 82, 603–610.

Yaqoob, Pala, Cortina-Borja, Newsholme and Calder. Encapsulated fish oil enriched in a-tocopherol alters plasma phospholipid and mononuclear cell fatty acid compositions but not mononuclear cell function. *European Journal of Clinical Investigation* 2000; 30, 260–274.

Yoshimura, Inoue, Kawahito, Mitsuhashi, Tsuchida, Matsuyama, Sano, Nakatani. Expression of 12-lipoxygenase in human renal cell carcinoma and growth prevention by its inhibitor. *Int J Mol Med*. 2004;13(1):41-6.

Young, Conquer. Omega-3 fatty acids and neuropsychiatric disorders. *Reprod. Nutr.Dev.* 2005;45(1):1-28.

Yu, Schneider, Boeglin, Marnett and Brash. The lipoxygenase gene ALOXE3 implicated in skin differentiation encodes a hydroperoxide isomerase. *PNAS* 2003; 100 (16): 9162–9167

Zamaria. Alteration of polyunsaturated fatty acid status and metabolism in health and disease. *Reprod Nutr Dev*. 2004;44(3):273-82.

Zerouga, Jenki, Booster, Stillwell. Can docosahexaenoic acid inhibit metastasis by decreasing deformability of the tumor cell plasma membrane? *Cancer Letters* 1997, 119: 163-168.

Zerouga, Stillwell, Stone, Powner, Dumaul, Jenki. Phospholipid class as a determinant in docosahexaenoic acid's effect on tumor cell viability. *Anticancer Res.* 1996;16, 2863–2868.

Zhu, Gong, Yang, Ge, Han, Chen. Green tea and its major components ameliorate immune dysfunction in mice bearing Lewis lung carcinoma and treated with the carcinogen NNK. *Nutr Cancer* 1999, 35, 64–72.