



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO
Dipartimento di Farmacia

Dottorato di ricerca
in Biologia dei Sistemi
Ciclo XIII — Anno di discussione 2015

Coordinatore: Chiar.mo Prof. *Antonietta Leone*

***Effetti degli acidi grassi polinsaturi sui
processi di sviluppo e progressione
tumorale***

settore scientifico disciplinare di afferenza: BIO/10

Dottorando

Dott. *Tania Rescigno*

Tutore

Chiar.mo Prof. *Mario Felice Tecce*

INDICE

ABSTRACT	pag	1
CAPITOLO 1. Nutrizione e cancro	pag	3
1.1 Fattori cancerogeni della dieta	pag	3
1.2 Nutrienti chemiopreventivi	pag	5
1.3 Apporto lipidico e cancerogenesi	pag	7
CAPITOLO 2. Gli acidi grassi polinsaturi della serie Omega 3	pag	9
2.1 Aspetti base dei PUFA	pag	10
2.2 n-3 PUFA e cancro	pag	13
CAPITOLO 3. Proliferazione e ciclo cellulare	pag	15
3.1 La cascata di ERK	pag	16
3.2 Il fattore di trascrizione STAT3	pag	18
3.3 p21 ^{Waf1/Cip1} : un regolatore negativo del ciclo cellulare	pag	20
3.4 p53: il guardiano del genoma	pag	22
CAPITOLO 4. Carcinoma mammario	pag	24
4.1 Epidemiologia e biologia	pag	24
4.2 Linee cellulari come modelli di neoplasie mammarie	pag	26
CAPITOLO 5. Scopo della tesi	pag	30
CAPITOLO 6. Materiali e metodi	pag	32
6.1 Linee cellulari e mezzi di coltura	pag	32
6.2 Preparazione delle sostanze da somministrare	pag	33
6.3 Saggio MTT di vitalità cellulare	pag	33
6.4 Analisi citofluorimetriche	pag	34
6.5 Estrazione delle proteine	pag	34
6.6 Western Blotting	pag	35

6.7 Estrazione dell'RNA totale e retrotrascrizione	pag	37
6.8 Real Time – PCR (Polymerase Chain Reaction)	pag	37
 CAPITOLO 7. Risultati	 pag	 38
7.1 Effetto del DHA sulla vitalità di linee cellulari mammarie	 pag	 38
7.2 Effetti del DHA sul ciclo cellulare	pag	41
7.3 Effetto del DHA sull'attivazione dei pathway di ERK1/2 e STAT3	 pag	 46
7.4 Effetto del DHA sull'espressione di p21 ^{Waf1/Cip1}	 pag	 49
7.5 Effetto del DHA sull'espressione di p53	 pag	 53
 CAPITOLO 8. Discussione e conclusioni	 pag	 55
 Bibliografia	 pag	 60
 SEZIONE SPECIALE: Studio degli effetti molecolari di campi elettrici e magnetici sui sistemi biologici	 pag	 75
 Bibliografia – Sezione speciale	 pag	 79

Abstract

This study is part of ongoing research on the relationship between nutrition and neoplastic diseases. Numerous *in vitro* and *in vivo* analyses showed the ability of several nutritional factors to affect carcinogenesis and tumor progression processes. n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs), such as eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), present at high levels in fish products, showed many beneficial effects on cardiovascular diseases. Furthermore, various biochemical and cellular activities of these nutrients suggest that they could interfere with onset and progression of different kind of neoplasia, including breast cancer. However, molecular mechanisms by which these nutrients may affect breast carcinogenic processes have not been completely clarified. Therefore, the aim of this project was to further analyze the effects of these nutrients on the mechanisms underlying breast cancer development.

Following treatments with different concentrations of DHA, we examined cell viability, mortality and cell cycle progression in breast cell lines with different degree of transformation and biochemical characteristics (MCF-10A, MCF-7, SK-BR-3, ZR-75-1). Viability of MCF-7 and ZR-75-1 showed low sensitivity to DHA treatment, while an high anti-proliferative effect was caused by this nutrient in MCF-10A and SK-BR-3 cell lines. In particular, DHA induced a strong G0/G1 arrest of MCF-10A cells which was not detected in the other examined mammary cell lines. Possibly involved molecular factors were also assessed at protein and mRNA levels. The activation of ERK1/2 and STAT3 pathways and the expression of some molecules involved in cell cycle regulation (p21^{Waf1/Cip1} and p53) resulted differentially regulated by DHA treatments in each cell line.

Data showed that DHA is able to affect cell viability, cell cycle and proliferation factors activity, in a different way in each breast cell line assayed. Although by different mechanisms, DHA produced a relevant growth inhibition of two breast cell lines with different transformation degrees and biochemical characteristics. These findings suggest a possible variable role of DHA in etiology and in development of breast cancer, which might be dependent on the molecular properties and the malignancy degree of each individual neoplasia.

CAPITOLO 1. Nutrizione e cancro

Studi epidemiologici supportati da analisi sperimentali condotte sia *in vivo* che *in vitro* hanno contribuito negli anni ad individuare il potenziale legame esistente tra la dieta, intesa come apporto giornaliero di fattori nutrizionali quali carboidrati, lipidi, proteine, vitamine e oligoelementi, ma anche di nutrienti bioattivi (sostanze con specifiche attività biologiche, assorbite dagli alimenti) e l'insorgenza e/o la prevenzione di patologie cancerose.

I tumori o neoplasie costituiscono una classe di malattie caratterizzate da una incontrollata riproduzione di alcune cellule dell'organismo, che smettono di rispondere ai meccanismi fisiologici di controllo cellulare a seguito di danni a carico del loro patrimonio genetico. Tali cellule, che si moltiplicano in maniera abnorme e disordinata, possono, in seguito, infiltrare i tessuti vicini e diffondersi in tutto l'organismo. I geni più frequentemente coinvolti nell'eziologia delle patologie neoplastiche comprendono: i "protooncogeni", che normalmente stimolano la proliferazione cellulare, per cui quando sono mutati la stimolazione risulta continua; i geni "oncosoppressori", i quali normalmente frenano la crescita delle cellule, per cui quando perdono la loro funzione, viene favorita la moltiplicazione cellulare; i geni "riparatori" di danni del DNA, che in caso di malfunzionamento favoriscono l'insorgenza di un tumore non correggendo gli errori che possono verificarsi durante le fasi di duplicazione del materiale genetico e consentendo, pertanto, l'accumulo di mutazioni.

Le cause dell'insorgenza dei tumori risiedono sia in fattori ambientali che genetici. Gli studi più recenti dimostrano come buona parte dei tumori siano attribuibili a fattori alimentari ed al tabagismo. Un'altra porzione consistente costituirebbero il risultato di effetti legati all'obesità, come anche fattori professionali, infezioni, alcol, esposizione ai raggi UV, droghe, inquinamento. Solo una quota più piccola sarebbe, infine, provocata da fattori primariamente ereditari.

Gli effetti, sia positivi che negativi, della dieta sulla cancerogenesi, spontanea o indotta negli animali di laboratorio, sono noti da molto tempo. Lo studio dei meccanismi attraverso i quali la dieta influisce sulla comparsa di patologie neoplastiche, può contribuire all'individuazione di iter chemiopreventivi ed, eventualmente, anche chemioterapeutici e potrà, inoltre, consentire una migliore comprensione degli aspetti fondamentali della cancerogenesi e del comportamento tumorale.

1.1 Fattori cancerogeni della dieta

Diversi fattori nutrizionali sono stati identificati, negli anni, come rilevanti ai fini della cancerogenesi.

a. *Le micotossine.* Sono sostanze chimiche tossiche prodotte dai funghi che si ritrovano spesso come contaminanti di diversi tipi di alimenti. Risulta oggi evidente l'esistenza di una relazione tra il consumo di cibi ricchi di micotossine e varie forme di neoplasie. Ad esempio, le aflatossine sono state messe in relazione con il tumore epatico (Aguilar F *et al.*, 1993; Ueng YF *et al.*, 1995; Wang H *et al.*, 1998). Le fumonisine sono implicate nell'eziologia del carcinoma esofageo in alcune regioni del Sud-Africa e della Cina (IPCS, 2000; Stockmann-Juvala H *et al.*, 2004). L'ocratossina A, metabolita secondario di alcune specie di *Aspergillus* e *Penicillium*, a

Introduzione

seconda della dose, può risultare cancerogena, genotossica, immunotossica o teratogena (Mally A, 2012).

b. *Gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA)*. Sono composti che si formano durante la combustione incompleta di materia organica, come il carbone (Goldman R and Shields PG, 2003) e possono depositarsi sulla superficie della carne grigliata o del pesce affumicato durante la cottura. Molti di essi presentano proprietà cancerogene sperimentalmente dimostrate. Tra i principali cancerogeni appartenenti a questa categoria abbiamo: il benzo(a)pirene, l'1,2,5,6-dibenzantracene, il 3-metilcolantrene, il 7,12-dimetilbenz(a)antracene e il benz(a)antracene (IARC, 2014).

c. *Gli N-nitroso composti*. Questa classe di molecole include le nitrosoammine che possono trovarsi naturalmente nei cibi (ad esempio la birra, i vegetali, il pesce, la carne, i salumi e i formaggi), oppure possono essere prodotte a partire da nitriti mediante trattamenti di cottura quali la frittura o l'arrostitura. Circa l'80% delle nitrosammine saggiate sperimentalmente *in vivo*, hanno mostrato proprietà cancerogene, producendo tumori al fegato, polmone, rene, ghiandola mammaria, stomaco, pancreas, vescica o esofago (Lijnsky W *et al.*, 1990). Nell'uomo, le nitrosamine introdotte con la dieta risultano implicate nell'eziologia del carcinoma gastrico e intestinale, esofageo e del tratto naso-faringeo (Chhabra SK *et al.*, 1996; Schuller HM, 1997; Jakszyn P *et al.*, 2006).

d. *Le amine eterocicliche (Heterocyclic amines HCAs)*. Sono molecole prodotte durante la cottura di cibi acido-proteici come la carne ed il pesce (Sugimura T, 2000). Un elevato numero di HCAs sono state purificate e caratterizzate, mentre la loro cancerogenicità è stata dimostrata mediante saggi *in vivo*. La famiglia delle HAC presenta caratteristiche pluripotenti nell'induzione del cancro, in quanto questi composti possono colpire diversi organi: fegato, polmone, vescica, intestino, stomaco, pelle, cavità orale, mammella, tessuto linfatico, dotti uditivi e prostata (Sugimura T, 2002).

e. *Nitriti e nitrati*. Di-alchil-nitrosammine, quali la di-metil-nitrosamina, possono essere prodotte da di-metilamina e nitrito, sostanze normalmente contenute nei cibi, in condizioni di pH acido. Si tratta di molecole mutagene in seguito ad attivazione metabolica e di cui è stata dimostrata la cancerogenicità (Sugimura T, 2000). Sperimentazioni *in vivo* hanno evidenziato che, l'alimentazione di cavie con una combinazione di amine secondarie e nitrato era in grado di stimolare il processo di cancerogenesi (Sander J and Schweinsberg F, 1972).

f. *Le calorie totali*. Un generale effetto della restrizione calorica di inibizione del processo di tumorigenesi è stato dimostrato mediante numerosi studi condotti su diversi modelli animali. Gli animali cresciuti in condizioni di restrizione energetica sviluppano molti meno tumori rispetto a quelli alimentati *ad libitum* (Kritchovsky D, 1992). Da tempo è stata stabilita anche la relazione inversa, ossia l'eccessiva assunzione di calorie, con conseguente deposito di grasso, rappresenta un fattore di rischio per lo sviluppo di neoplasie (Sugimura T, 2000; La Guardia M and Giammanco M, 2001). Difatti, ad esempio, la digestione, l'assorbimento, il metabolismo e l'escrezione di un eccesso di nutrienti, richiede, in generale, l'iperattivazione di un metabolismo ossidativo che produce numerose specie reattive dell'ossigeno capaci di indurre un danno al DNA (Loft S and Poulsen HE, 1996).

g. *Apporto di carboidrati*. Di crescente interesse risulta il potenziale legame tra il carico glicemico (glycemic load, GL), che misura la quantità di carboidrati contenuti in un pasto, l'indice glicemico (glycemic index, GI), che indica quanto rapidamente un cibo viene digerito e rilasciato nel sangue come glucosio e lo sviluppo del carcinoma mammario. Recenti meta-analisi di studi di coorte mostrerebbero una chiara associazione tra valori di GL e GI, l'iperinsulinemia e l'aumento del rischio di

neoplasie al seno (Dong JY and Qin LQ, 2011). Tuttavia, in altri tipi di tumore, come quello del colon, non è stata, invece, stabilita alcuna relazione con diete ricche in carboidrati, GL o GI (Aune D *et al.*, 2012).

h. *alcol*. La relazione tra consumo di alcol e rischio di cancro è oggi fermamente riconosciuta (Schütze M *et al.*, 2011). L'alcol costituisce la causa più frequente di carcinoma epatocellulare (HCC) (Morgan TR *et al.*, 2004), ma è da mettere in relazione anche con altri tipi di tumori, come quelli della cavità orale e della faringe (Goldstein BY *et al.*, 2010), del colon-retto (Fedirko V *et al.*, 2011), del seno (Kwan ML *et al.*, 2010) e della prostata (Rizos Ch *et al.*, 2010). In effetti, l'etanolo e il suo metabolita acetaldeide sono considerati come agenti cancerogeni, oltre che tossici a vari altri livelli.

1.2 Nutrienti chemiopreventivi

Diverse istituzioni riconosciute a livello internazionale come il World Cancer Research Fund (WCRF) o l' American Institute for Cancer Research (AICR), raccomandano un'adeguata e abituale assunzione di frutta e verdura con la dieta, vista la ben nota e dimostrata relazione inversa tra il consumo di questi cibi e il rischio di sviluppo di patologie cancerose. Gli effetti benefici sulla salute umana, favoriti da regimi alimentari ricchi in frutta e verdura, derivano essenzialmente dalle sostanze (soprattutto i composti polifenolici), potenzialmente protettive, contenute in questi alimenti.

Accanto alla loro azione antiossidante diretta, i composti polifenolici sono spesso in grado di influenzare diverse vie metaboliche (Androutsopoulos VP *et al.*, 2010) che controllano funzioni cellulari sia in condizioni fisiologiche che patologiche. Il resveratrolo, contenuto soprattutto nell'uva, mostra una potenziale azione positiva sul tumore della prostata (Jasiński M *et al.*, 2013), carcinoma epatocellulare (Bishayee A *et al.*, 2010), melanoma (Tong LX and Young LC, 2014), mentre l'acido caffeico su tumori del polmone e della prostata e melanomi (Ozturk G *et al.*, 2012). I flavonoidi della frutta rossa hanno effetti benefici sul tumore dello stomaco (Wang P *et al.*, 2012) mentre quelli del melograno influenzano positivamente i carcinomi cutanei, mammari, prostatici, del colon e del polmone (Adhami VM *et al.*, 2009). Il licopene è indicato per la prevenzione del tumore della prostata (Tan HL *et al.*, 2010). L'epigallocatechina-3-gallato costituisce il principale polifenolo contenuto nel tè verde di cui diversi studi *in vitro* e *in vivo* ne avrebbero dimostrato un'azione chemiopreventiva (Henning SM *et al.*, 2011; Shimizu M *et al.*, 2011).

Il diallil trisolfuro è un caratteristico componente dell'aglio e similari (cipolla, porro, erba cipollina, ecc) con attività ipolipidemiche e ipoglicemiche, attiva contro patologie cardiovascolari e metaboliche. Il meccanismo d'azione alla base dell'effetto chemiopreventivo di questo composto non è stato ancora ben stabilito, anche se esso avrebbe dimostrato di inibire l'angiogenesi e di stimolare pathway metabolici responsabili della detossificazione cancerogena e dell'induzione dell'apoptosi cellulare (Antony ML and Singh SV, 2011).

Le vitamine E, C e D e il selenio hanno in comune proprietà antiossidanti fondamentali che contrastano lo stress ossidativo e i suoi effetti dannosi per l'organismo, prevenendo anche la carcinogenesi. Tuttavia, lo stress ossidativo è un processo naturale con effetti positivi, come quello di incentivare la risposta immunitaria. In effetti esistono risultati contrastanti circa il ruolo delle vitamine E, C e del selenio nel carcinoma epatocellulare (Glauert HP *et al.*, 2010) e prostatico

Introduzione

(Trottier G *et al.*, 2010), e dalla vitamina D e acido folico nel tumore del pancreas (Sanchez GV *et al.*, 2012).

Gli isoflavoni sono, tra i flavonoidi, i composti più studiati (soprattutto gli isoflavoni di soia), caratterizzati da attività anti-estrogeniche (essi competono principalmente per il recettore beta degli estrogeni), anti-proliferative, anti-angiogeniche e pro-apoptotiche in cellule tumorali (Nagata C *et al.*, 2010). Non esistono però dati in grado di dimostrare chiaramente l'effetto benefico degli isoflavoni della soia. Risultati *in vitro* mostrano effetti positivi ma studi caso-controllo e trials clinici di fase III hanno portato a risultati inconcludenti per alcuni tipi di tumori come neoplasie mammarie o prostatiche (Nagata C *et al.*, 2010).

L'assunzione di frutta, verdura e cereali fornisce la quantità di fibre necessaria per il nostro organismo, di cui il range raccomandato è di 21-38 g/giorno. L'effetto protettivo della fibra, associato principalmente al tumore del colon-retto, si estende anche ad altri tipi di tumore. È stata dimostrata una riduzione dell'11% del rischio di carcinoma mammario in soggetti con un più alto intake di fibra rispetto a quelli con un intake più basso (Dong JY *et al.*, 2011). I meccanismi di azione proposti alla base degli effetti della fibra sul tumore colon-rettale (Aune D *et al.*, 2011) sono mostrati in Fig.1 e consistono in una serie di attività che insieme potrebbero spiegare i benefici della fibra non solo nei confronti di patologie neoplastiche, ma anche del diabete, di patologie infiammatorie o cardiovascolari.

Il tè verde, *Camellia sinensis*, è rinomato per i suoi effetti benefici sulla salute e sul rischio tumorale. In realtà, un numero ancora piuttosto limitato di dati preclinici e clinici supporterebbero tali convinzioni (Khan N and Mukhtar H, 2010) specialmente sull'incidenza del carcinoma epatocellulare (Li Y *et al.*, 2011). Come per il tè verde, anche l'assunzione regolare di caffè è stata associata ad un ridotto rischio di carcinoma epatocellulare. Queste affermazioni sono supportate da due meta-analisi di diversi studi di coorte e caso-controllo (Bravi F *et al.*, 2007; Larsson SC and Wolk A, 2007).

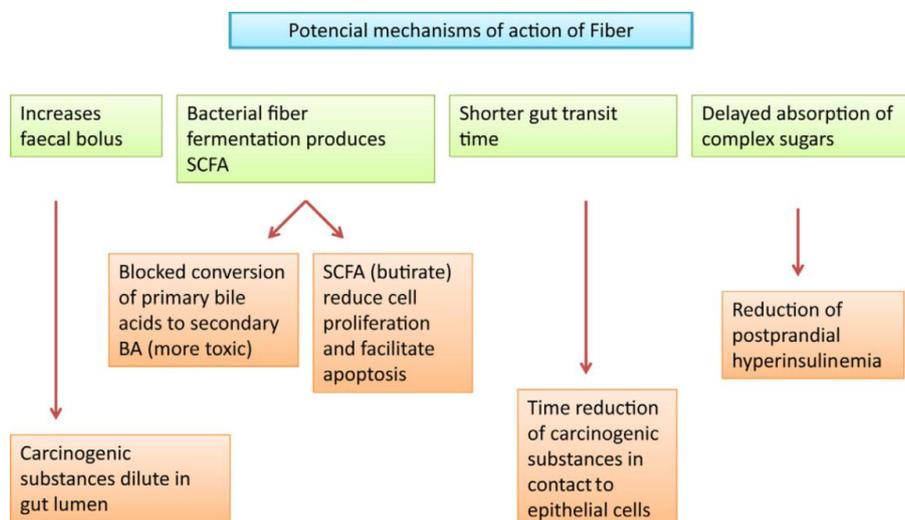


Figura 1. Schema dei potenziali meccanismi di protezione della fibra nei confronti del carcinoma del colon retto.

1.3 Apporto lipidico e cancerogenesi

Tra i molteplici componenti della dieta che sono stati relazionati al cancro, i lipidi sono considerati tra i più rilevanti. Studi epidemiologici e soprattutto sperimentali hanno, già da tempo, stabilito una relazione tra grassi alimentari e tumori del seno, del colon-retto e della prostata (Bartsch *et al.*, 1999; Kolonel LN *et al.*, 1999). Inoltre, altri studi dello stesso tipo avrebbero suggerito un'associazione positiva tra l'intake totale di grassi e il rischio tumorale (Kushi L and Giovannucci E., 2002). Tuttavia, partendo da questi dati, resta comunque difficile giungere a delle conclusioni certe (Dennis L *et al.*, 2004).

I dati sull'uomo riguardanti l'associazione tra i lipidi della dieta e le patologie neoplastiche risultano piuttosto contrastanti. Studi epidemiologici (studi di migrazione e di correlazione) hanno suggerito l'esistenza di una associazione positiva tra l'intake lipidico totale e il rischio di tumori mammari, colon rettali e prostatici (Kushi L and Giovannucci E, 2002). È interessante notare che, i Paesi dove è diffusa la dieta Mediterranea, caratterizzata da un elevato consumo di fibre, pesce, frutta, verdura e olio di oliva, mostrano valori medi per questi tumori. Un numero in espansione di indagini caso-controllo (retrospettivi) avrebbero individuato anche un incremento del rischio tumorale con l'aumentare dell'intake lipidico, specialmente in termini di grassi saturi e di origine animale (Kushi L and Giovannucci E, 2002). Tuttavia, è difficile trarre conclusioni chiare da questi studi a causa del recall bias (Dennis LK *et al.*, 2004). Per quanto riguarda gli studi retrospettivi di coorte, più opportunamente condotti, presi insieme essi non supportano una forte associazione tra l'apporto lipidico totale o di singoli acidi grassi durante la vita e lo sviluppo di neoplasie (Hunter DJ *et al.*, 1996; Hunter DJ, 1999). Diverse "pooled-analyses" non avrebbero osservato, in generale, alcuna correlazione tra l'apporto lipidico totale, di acidi grassi saturi, monoinsaturi o polinsaturi e il rischio tumorale (Hunter DJ *et al.*, 1996; Hunter DJ, 1999). D'altra parte, i lipidi e il metabolismo lipidico nell'organismo non riflettono direttamente la composizione lipidica della dieta. Essi sono, in realtà, il risultato di una complessa interazione tra tutti i componenti della dieta e altri fattori, tra cui quelli legati allo stile di vita e genetici. Per stabilire se effettivamente un regime alimentare ricco in grassi sia responsabile di un aumento dell'incidenza di determinati tipi di tumori o della relativa mortalità, sarebbero necessari ampi trial interventistici, adeguatamente potenti, randomizzati e controllati (Lee MM and Lin SS, 2000). Ad oggi, nessuna analisi di questo tipo è stata ancora effettuata (Gerber M, 2009) e nessuno studio di coorte o caso-controllo è riuscito a mettere luce sulla questione. Dunque, l'associazione tra lipidi alimentari e cancro nelle popolazioni umane resta ampiamente irrisolta.

Diversi studi animali hanno fornito dati significativi a supporto della relazione tra lipidi della dieta e neoplasie, soprattutto mammarie (Fay MP and Freedman LS, 1997). Risultati sperimentali dimostrano che l'effetto dei grassi alimentari sulle neoplasie dipende dalla qualità e dalla quantità di grassi consumati (Bougnoux P *et al.*, 2008) oltre che dallo stadio del processo di cancerogenesi in cui essi agiscono. Modelli di cancerogenesi avrebbero anche evidenziato un potenziale contributo da parte di specifici tipi di lipidi (Wynder EL *et al.*, 1997; Rose D and Connolly JM, 1999; Bartsch H *et al.*, 1999; Kolonel LN *et al.*, 1999).

Gli effetti dei grassi sull'incremento dell'incidenza di patologie cancerose possono essere in parte giustificati dal fatto che la loro assunzione risulta inevitabilmente accompagnata da un incremento dell'intake calorico. Tuttavia, i lipidi e

Introduzione

i loro metaboliti potrebbero giocare un ruolo diretto nel signalling oncogeno attraverso diversi meccanismi (Reddy *et al.*, 1991-1992):

a) la stimolazione da parte dei lipidi della secrezione di acidi biliari ed il metabolismo di acidi biliari secondari citotossici, nel colon, indurrebbero un danno alle cellule epiteliali del colon con conseguente iper-proliferazione cellulare. Tali fattori sono ritenuti i promotori dello sviluppo tumorale;

b) la stimolazione da parte degli acidi biliari del rilascio di arachinodato e la sua conversione a prostaglandine, potrebbero interferire con i normali meccanismi di regolazione della proliferazione cellulare;

c) gli acidi grassi polinsaturi (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) rappresentano probabilmente un buon target per la generazione di radicali liberi; la perossidazione lipidica che li coinvolge, conduce alla formazione di propano esociclico e malondialdeide, capaci di formare addotti con il DNA (Chaudhary AK *et al.*, 1994);

d) il grasso assunto in eccesso si accumula nelle cellule adipose; la conseguenza è un aumento delle aromatasi, enzimi che catalizzano la conversione degli androgeni in estrogeni. Questo pathway indiretto potrebbe essere responsabile dell'incremento di sviluppo del tumore al seno (O'Neill *et al.*, 1988);

e) le lipoproteine a bassa densità (LDL) ossidate possono promuovere la trasformazione cellulare attraverso il pathway di NFkB (Hirsch HA *et al.*, 2010):

f) l'overespressione della monoacilglicerolo lipasi, enzima che interviene nel processo della lipolisi, può aumentare la migrazione, l'invasione e la sopravvivenza di cellule tumorali (Nomura DK *et al.*, 2010).

Gli acidi grassi polinsaturi della serie Omega 6 (n-6 PUFA), specialmente l'acido linoleico (LA) (18:2 n-6), contenuti soprattutto negli oli vegetali, hanno mostrato un effetto stimolante su tumori del seno, del colon e della prostata in modelli animali (Carroll KK and Parenteau HI, 1991; Fay MP *et al.*, 1997; Rose DP, 1997; Bartsch H *et al.*, 1999). Anche i regimi alimentari ad alto contenuto di grassi saturi, soprattutto di origine animale, avrebbero dimostrato di favorire la carcinogenesi, anche se con minore entità rispetto alle diete ricche in LA.

Tra i PUFA ω -6, l'acido arachidonico (AA) funge da substrato per la cicloossigenasi-1 e la cicloossigenasi-2, portando alla formazione di prostanoidei tra cui la prostaglandina E2 (PGE2) che sembra coinvolta nella cancerogenesi del colon. Le prostaglandine esercitano un effetto sulle risposte immunitarie attraverso la stimolazione cellulare. Diversi studi suggeriscono che alcuni eicosanoidi possono avere un'influenza sulla crescita cellulare e la promozione del cancro e che una loro produzione inappropriata potrebbe costituire il legame tra acidi grassi assunti con la dieta e cancerogenesi (Singh J *et al.*, 1997).

Al contrario, invece, la maggior parte dei lavori condotti sul rapporto tra assunzione di acidi grassi polinsaturi Omega 3 ed insorgenza di patologie neoplastiche, hanno portato alla conclusione che tali sostanze esercitano un'azione protettiva nei confronti di diversi tipi di neoplasie, anche se non esiste ancora accordo sulla sede e sui tipi di tumore.

CAPITOLO 2. Gli acidi grassi polinsaturi della serie Omega 3

Gli acidi grassi polinsaturi della serie Omega 3 (n-3 PUFA) costituiscono un gruppo di acidi grassi polinsaturi che presentano il primo doppio legame dopo il terzo atomo di carbonio a partire dall'estremità metilica della catena carboniosa. Essi possono influenzare i sistemi biologici attraverso diversi meccanismi (Fig. 2), inducendo, in tal modo effetti su diversi processi fisiologici che possono influenzare il normale stato di salute ma anche il decorso di patologie croniche, come la regolazione dei livelli lipidici nel plasma (Mori T *et al.*, 2000), l'attività immunitaria (Hwang D, 2000) e cardiovascolare (Leaf A, 2001), l'azione dell'insulina (Storlien L *et al.*, 1998), lo sviluppo neuronale e la funzione visiva (Salem N *et al.*, 2001). L'assunzione di n-3 PUFA potrebbe potenzialmente portare alla loro distribuzione a tutte le cellule dell'organismo, con effetti sulla composizione e funzione delle membrane cellulari, sulla sintesi di eicosanoidi, e su diverse vie di traduzione del segnale fino anche a livello della regolazione dell'espressione genica (Jump DB *et al.*, 1999; Duplus E *et al.*, 2000). Tuttavia, il metabolismo lipidico cellula-specifico come anche l'espressione di fattori di trascrizione regolati da acidi grassi, probabilmente giocano un ruolo importante nel determinare il modo in cui i diversi tipi di cellule rispondono alle variazioni dei livelli di PUFA.

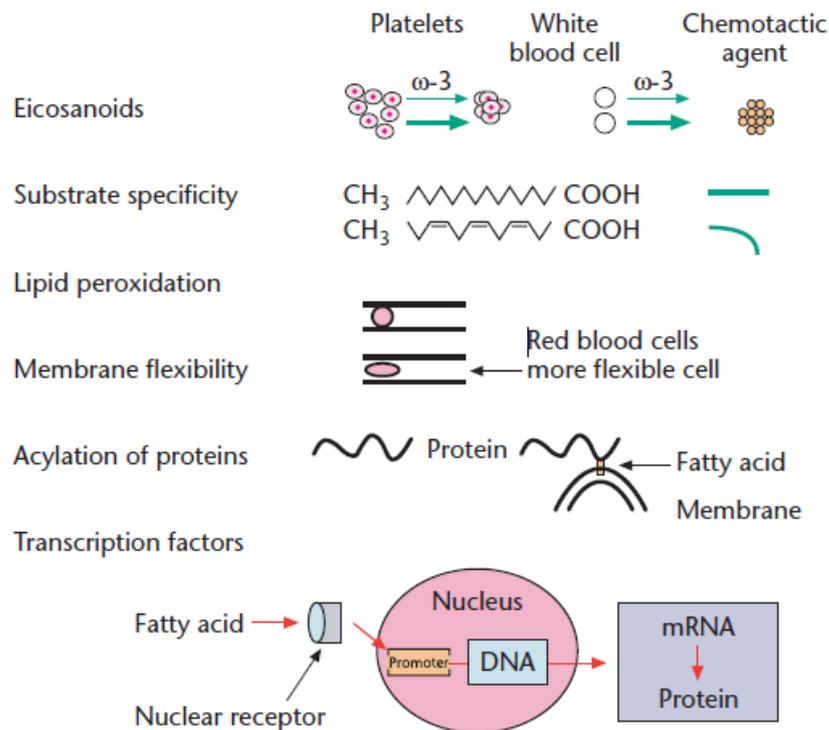


Figura 2. Meccanismi d'azione dei PUFA sui sistemi biologici. Ad esempio, i trombossani sintetizzati nelle piastrine favoriscono l'aggregazione piastrinica nel sangue. I leucotrieni nei globuli bianchi agiscono come agenti chemiotattici attirando altri globuli bianchi.

2.1 Aspetti base dei PUFA

L'acido α -linolenico (ALA) della serie Omega 3 (18:3 n-3), insieme all'acido linoleico (LA) della serie Omega 6, non possono essere sintetizzati dall'uomo e, pertanto, devono essere attinti da fonti alimentari (Fig. 5), a causa della non disponibilità delle desaturasi Δ 12- e Δ 15- (presenti invece nelle piante) e necessarie per la conversione dell'acido oleico ad ALA e LA. Per questo motivo, ALA e LA, molto abbondanti negli oli vegetali, sono considerati acidi grassi essenziali nella dieta umana (Spector AA, 1999).

La maggior parte di ALA e LA assunti con la dieta sono catabolizzati mediante ossidazione in ATP oppure sono immagazzinati nel tessuto adiposo, mentre solo una piccola porzione di essi viene convertita in altri acidi grassi della stessa famiglia (Cunnane SC and Anderson MJ, 1997; Arterburn L *et al.*, 2006). In particolare, ALA è precursore dell'acido eicosapentaenoico (EPA) (20:5 n-3) e dell'acido docosaesanoico (DHA) (22:6 n-3) mentre LA è precursore dell'acido arachidonico (20:4 n-6) (Fig. 3).

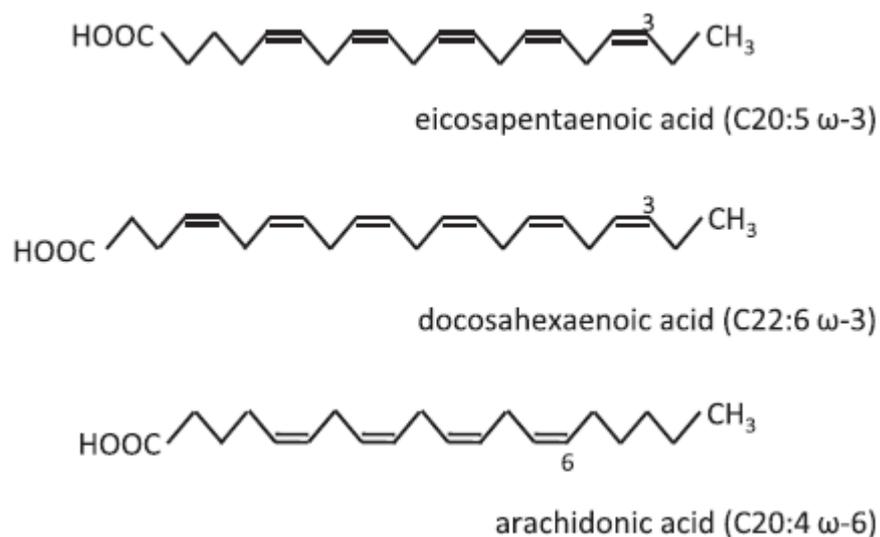


Figura 3. Struttura e nomenclatura dei principali acidi grassi polinsaturi (PUFA). Cx:y ω -z si riferisce alla struttura chimica, dove x corrisponde al numero di atomi di carbonio, y al numero di doppi legami carbonio-carbonio e z indica la posizione del primo doppio legame carbonio-carbonio a partire dall'estremità metilica della catena carboniosa. Tutti i doppi legami sono in configurazione cis.

Il fegato costituisce il principale organo responsabile della conversione di ALA e LA, e pazienti con deficit epatico spesso mostrano una ridotta sintesi dei loro metaboliti a lunga catena (Burke P *et al.*, 1999). Per cui anche EPA, DHA e AA sono considerati acidi grassi essenziali. Come ALA e LA, EPA, DHA e AA sono stati ritrovati negli accumuli di trigliceridi del tessuto adiposo, anche se in proporzioni molto piccole (Lin D and Conner WE, 1990).

Introduzione

L'ALA viene convertito in EPA ed, in seguito, in DHA attraverso un'alternanza di reazioni successive di elongazione della catena e di desaturazione (Fig. 4), anche se l'efficienza di conversione è piuttosto bassa (Gerster H, 1998). Inoltre, anche in individui sani, è stata individuata un'ampia variabilità di questa conversione in funzione del sesso e dell'età (Brenna JT, 2002; Burdge GC and Wootton SA, 2002). Nei mammiferi si verifica la retro-conversione del DHA a EPA, e il rapporto è di circa l'1,4% in soggetti che consumano una normale quantità di DHA con la dieta (Brossard N *et al.*, 1996).

La trasformazione di ALA in EPA e DHA può essere inibita in maniera consistente da una dieta ricca in LA, in quanto ALA e LA sono metabolizzati dallo stesso set di desaturasi ed elongasi, per cui esiste una naturale competizione tra questi due acidi grassi (Guillou H *et al.*, 2010). La delta-6-desaturasi catalizza la desaturazione iniziale di questi due acidi grassi (Fig. 4) e mostra una più alta affinità nei confronti dell'ALA piuttosto che del LA, a condizione che essi si trovino in un rapporto compreso tra 1:1 a 1:4 (Senadheera S *et al.*, 2011). Un più alto intake di LA, tipico delle moderne diete occidentali (rapporto ALA/LA di 1:18,75) perciò tende a frenare la conversione dell'ALA (Simopoulos AP, 2008).

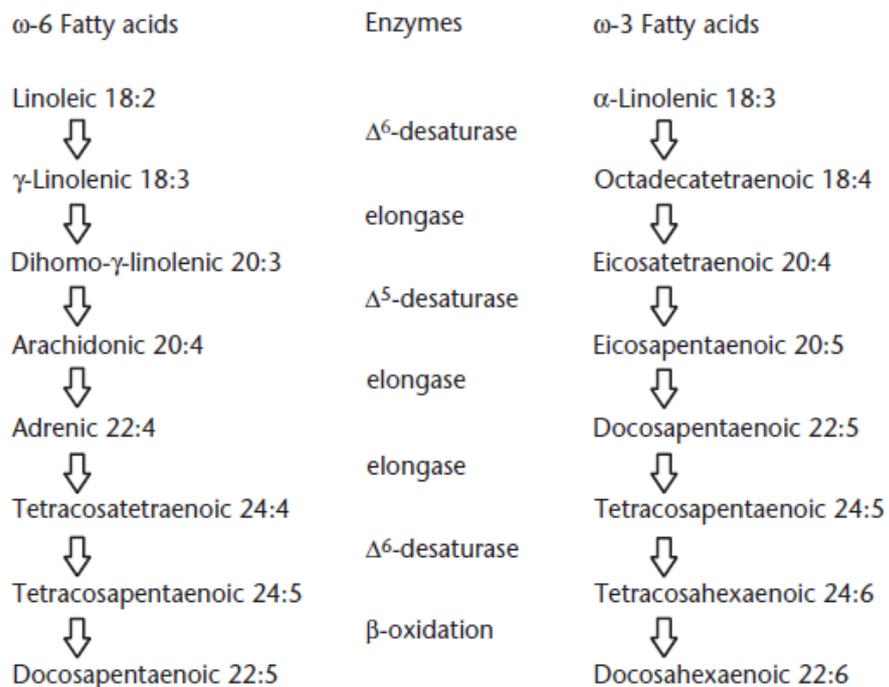


Figura 4. Sintesi degli acidi grassi polinsaturi Omega 3 e Omega 6.

Mentre i grassi animali e il tuorlo d'uovo costituiscono importanti fonti naturali di AA, la fonte alimentare dominante di EPA e DHA è costituita dai pesci che si cibano delle alghe in cui essi vengono sintetizzati (Fig. 5) (Doughman S *et al.*, 2007). EPA, DHA e AA sono ben assorbiti dagli enterociti intestinali; dopodiché essi competono per la posizione sn-2 sui fosfolipidi di molti tipi di membrane cellulari, in particolare

Introduzione

delle membrane plasmatiche e mitocondriali, e sono rapidamente incorporati nelle membrane di tutte le cellule, incluse le cellule tumorali, dell'organismo (Jump DB, 2002). Siccome la sintesi endogena di EPA, DHA e AA è inefficiente, il loro contenuto nei fosfolipidi delle membrane cellulari dipende dal loro apporto con la dieta ed è indipendente dall'attività del genoma. Tuttavia, esiste una chiara competizione tra questi PUFA a lunga catena durante il processo di integrazione nei fosfolipidi di membrana, poiché gli Omega 3 e gli Omega 6 non sono discriminati dagli enzimi che ne esterificano le catene aciliche (Lands WE *et al.*, 1992). Di conseguenza, la supplementazione di EPA e/o DHA aumenta il loro contenuto all'interno delle membrane cellulari, mentre una carenza di questi composti porta ad una loro sostituzione compensatoria con AA nei fosfolipidi di membrana (Chapkin R *et al.*, 2002; Corsetto P *et al.*, 2011).

	Omega-3 (mg x 100 gr di alimento)	ALA (%)	EPA (%)	DHA (%)
PESCI				
Tonno fresco	3680	5,7	37,6	56,5
Aringa fresca	2777	2,2	73,3	24,3
Sardine sott'olio	2590	5,7	46,3	47,8
Sgombro	2003	12,4	31,4	56,1
Salmone fresco	1964	18,1	38,1	43,7
Sardine fresche	1434	3,0	40,4	56,4
Triglia	1150	0	30,4	69,5
Pesce spada	1020	22,5	12,7	64,7
Salmone affumicato	810	3,7	40,7	55,5
Trota	659	6,3	21,2	72,3
Acciughe/Alici	530	5,6	39,6	54,7
Nasello	416	8,4	56,9	34,6
Spigola	300	3,3	30	66,6
Coda di rospo	263	0,7	18,6	80,6
ALIMENTI RICCHI DI ALA (gr x100 gr di alimento)				
FRUTA SECCA/SEMI OLEOSI				
Concentrati oleosi di semi di lino		54,2 gr		
Semi di lino		16,7 gr		
Noci		7,5 gr		
Arachidi		0,54 gr		
Farina di soia		1,4gr		
Semi di soia		0,93gr		
Mandorle		0,26 gr		

Figura 5. Alimenti ricchi di acidi grassi Omega-3 (da Nannicini, 2008).

I fosfolipidi sono gli elementi costitutivi molecolari delle membrane cellulari, per cui gli acidi grassi EPA, DHA e AA inseriti nel doppio strato sono responsabili di

modificazioni delle proprietà biofisiche e della struttura della membrana stessa (Stillwell W and Wassall SR, 2003). Per esempio, la presenza di doppi legami multipli in questi acidi grassi li rende estremamente suscettibili alle specie reattive dell'ossigeno (ROS), che si ottengono dal metabolismo cellulare e da particolari condizioni extracellulari, rendendo le membrane cellulari target di rilievo dell'ossidazione mediata dai ROS. I ROS possono attaccare ogni doppio legame nei PUFA, innescando la perossidazione lipidica e perturbando la struttura e le funzioni della membrana cellulare (Niki E *et al.*, 2005). L'ossidazione dei PUFA, mediata dai ROS, produce una quantità molto elevata di prodotti con struttura carboniosa preservata o danneggiata. Molti di questi prodotti sono altamente reattivi, e sono capaci di generare reazioni a catena in grado di produrre altri ROS e di interagire con altre molecole e con i mitocondri per avviare la cascata apoptotica (McIntyre TM, 2012).

Cellule e tessuti di tipo diverso hanno composizioni fosfolipidiche differenti. L'incorporazione di EPA e DHA nelle membrane cellulari è perciò eterogenea, e varia a seconda del tipo cellulare e tissutale. L'acido grasso n-3 più abbondante nei fosfolipidi di membrana è il DHA, che generalmente supera l'EPA da 5 a 30 volte in molti tessuti. Livelli estremamente alti di DHA sono stati evidenziati nella corteccia cerebrale, nella retina e nei testicoli e risultano praticamente insensibili all'assunzione di tali acidi grassi con la dieta (Stillwell W *et al.*, 2005).

Grazie all'attività della fosfolipasi A2, i PUFA possono essere rapidamente rilasciati dalla posizione sn-2 dei fosfolipidi di membrana nelle loro forme non esterificate (libere) (Strokin M, 2003), che funzionano da precursori (in presenza di ciclossigenasi, lipossigenasi e citocromo P450 monossigenasi) di un gran numero di mediatori lipidici bioattivi, come prostaglandine (PG), leucotrieni (LT), trombossani (TX), lipossine e resolvine che rivestono ruoli importanti nella regolazione immunitaria (Shaikh SR and Edidin M, 2006), infiammazione (Wall R *et al.*, 2010), sopravvivenza e morte cellulare (Claria J, 2006).

2.2 n-3 PUFA e cancro

Il primo studio che ha evidenziato la capacità degli acidi grassi Omega 3 di influenzare positivamente lo stato di salute, fu condotto da Dyerberg e Bang, che scoprirono che questi acidi grassi erano responsabili della scarsa incidenza di patologie cardiovascolari tra le popolazioni eschimesi (Bang HO *et al.*, 1971). In seguito a queste prime scoperte, sono proseguite ampiamente le ricerche sugli effetti positivi degli n-3 PUFA nei confronti di diverse condizioni patologiche. Ad oggi, è quasi impossibile trovare un disordine umano sul quale l'effetto di questi acidi grassi non sia stato testato, e le conoscenze acquisite attraverso questi studi indicano che tali acidi grassi presentano un ampio raggio di effetti benefici sulla salute umana (Riediger ND *et al.*, 2009). In particolare, questi ultimi sembrano essere principalmente imputabili ai due membri più potenti di questa famiglia di acidi grassi, EPA e DHA, dato che gli effetti sulla salute del loro precursore, l'acido α -linolenico sono molto limitati (Oomen CM *et al.*, 2001; Albert CM *et al.*, 2005), ed EPA e DHA risultano circa 9 volte più potenti dell'ALA, secondo le stime di uno studio condotto su soggetti umani sani (Calder PC, 2006).

Esiste oggi una vasta gamma di evidenze del fatto che gli n-3 PUFA, in particolare EPA e DHA, presentano anche attività antitumorale. In molte popolazioni

Introduzione

umane sarebbe stata evidenziata una relazione tra un più alto consumo di cibi ricchi in acidi grassi Omega 3 e una più bassa incidenza di alcune comuni forme tumorali (Tavani A *et al.*, 2003; Kuriki K *et al.*, 2007). Inoltre, è stato osservato che gli n-3 PUFA sono in grado di rallentare lo sviluppo iniziale di diversi tipi di tumori sia in modelli *in vitro* che *in vivo* (Calviello G *et al.*, 1999; Liu G *et al.*, 2001; Berquin IM *et al.*, 2007). Studi clinici avrebbero anche dimostrato che un più alto intake di Omega 3 sia correlato ad un ridotto rischio di tumori della cute (Rhodes L *et al.*, 2003) e del colon retto (Cockbain A *et al.*, 2012). Inoltre, altri risultati ottenuti da ricerche, condotte su colture di cellule tumorali e su animali, rivelano che gli n-3 provocano ritardo nella crescita e la morte di cellule tumorali (Serini S *et al.*, 2008; Habermann N *et al.*, 2009) e che manifestano un effetto protettivo nei confronti di tumori a diverso stadio di progressione (Song KS *et al.*, 2011).

Queste ricerche insieme, non solo forniscono evidenze interessanti del diretto effetto inibitorio degli Omega 3 sulla carcinogenesi e sulla progressione tumorale, ma indicano anche che le proprietà antitumorali di questi acidi grassi potrebbero incidere sulle nuove capacità acquisite dal tumore stesso durante il suo sviluppo, attraverso una varietà di meccanismi. Oltre agli effetti inibitori diretti sullo sviluppo del cancro, un recente studio di coorte, esaminando la relazione tra Omega 3 e prognosi in pazienti che sono stati trattati nei primi stadi di carcinoma mammario, avrebbe dimostrato che un intake più alto in termini di EPA e DHA risulta associato con un ridotto rischio di peggioramento e in tutti i casi di mortalità (Patterson RE *et al.*, 2011). Questo implicherebbe che gli n-3 siano in grado, anche indirettamente, di interferire con la progressione tumorale, e potrebbero essere usati in combinazione con altre strategie antitumorali per ottenere prognosi più favorevoli.

CAPITOLO 3. Proliferazione e ciclo cellulare

Uno dei processi più importanti a cui vanno incontro periodicamente le cellule di mammifero proliferanti è rappresentato dal ciclo cellulare, che comporta la divisione della cellula ed il trasferimento dell'informazione genetica entro due nuove cellule figlie. Il ciclo cellulare si compie in 4 fasi (Fig. 6): la fase G1 (Gap1), nella quale avviene la sintesi degli mRNA e delle proteine necessarie per l'accrescimento cellulare; la fase S (di sintesi) durante la quale avviene la replicazione del DNA; la fase G2 (Gap 2) di preparazione alla mitosi; la fase M (mitosi) nella quale si ha la vera e propria divisione della cellula in due cellule figlie identiche alla cellula madre, anche per il contenuto cromosomico.

Il ciclo cellulare costituisce un processo critico per la cellula e deve, perciò, essere strettamente regolato per evitare l'iperproliferazione e l'instabilità genetica che possono portare a stati patologici come il cancro. La maggior parte delle cellule in un organismo adulto esistono in uno stato di quiescenza, non esprimendo un certo numero di geni associati al ciclo cellulare. Nelle cellule quiescenti, fattori di trascrizione e di traduzione necessari per iniziare il ciclo cellulare, sono repressi in maniera cellula-specifica dalla proteina del retinoblastoma (pRB). Nelle cellule che devono, invece, progredire attraverso il ciclo cellulare, pRB deve essere inattivata. La perdita di funzione di RB porta ad una alterazione della regolazione della proliferazione cellulare e può promuovere la progressione tumorale. Nel suo stato di iperfosforilazione, pRB si trova strettamente legata alla famiglia dei fattori di trascrizione E2F (che regolano l'espressione di geni codificanti proteine necessarie per la sintesi del DNA e per l'avanzamento del ciclo), prevenendo così la loro attività trascrizionale. L'inattivazione di pRB si ottiene attraverso l'accensione di una particolare classe di proteine, le chinasi ciclina-dipendenti (CDK).

Le CDK costituiscono una famiglia di serina-treonina chinasi di basso peso molecolare. L'attivazione delle CDK è strettamente dipendente dalla loro associazione con una ciclina regolatoria, la quale, a sua volta, è prodotta in risposta a qualche segnale mitogenico. Oltre al legame con la ciclina, le CDK sono regolate mediante fosforilazione. Per ottenere la piena attivazione dell'attività chinasi, le CDK devono essere fosforilate su un residuo di treonina, localizzato nel sito attivo, da una chinasi attivante le chinasi ciclina-dipendente (CAK). L'attività delle CDK è anche regolata dalla fosforilazione inibitoria mediata da Wee1 e dall'attività fosfatasi della famiglia delle fosfatasi Cdc25.

La regolazione dell'attività delle CDK, e di conseguenza la progressione del ciclo cellulare, non si ottiene soltanto attraverso modifiche post-traduzionali. Anche proteine come p21^{Cip1/Waf1} (inibitore della chinasi ciclina-dipendente 1A) e p27 (inibitore della chinasi ciclina-dipendente 2A) possono inibire la funzione di CDK. Queste proteine lavorano mediante il legame diretto alle CDK e ne inibiscono l'interazione con la sua ciclina attivante. Il legame di p21 a CDK determina un blocco della crescita e gioca anche un ruolo nella senescenza cellulare.

Il ciclo può essere attraversato in un'unica direzione dal momento che i suoi punti critici, quali i passaggi dalla fase G1 alla fase S, dalla metafase all'anafase, dall'anafase alla telofase e citocinesi, sono irreversibili perché dovuti alla degradazione regolata di proteine chiave. Infatti, nel passaggio dalla fase G1 alla fase S si verifica la degradazione di un inibitore del complesso ciclina/CDK di fase S; la transizione da metafase ad anafase è promossa dalla degradazione dell'inibitore (securina) di una proteasi (separasi) la quale agisce a livello dei complessi proteici che tengono uniti i cromatidi fratelli; il passaggio da anafase a telofase e citocinesi è

Introduzione

segnato dalla degradazione della ciclina mitotica e conseguente spegnimento dell'attività della CDK.

I segnali mitogenici che giungono alla cellula con il fine di promuoverne la proliferazione e, dunque, l'avvio del ciclo cellulare, vengono trasferiti all'interno della cellula attraverso numerose vie di trasduzione del segnale che coinvolgono numerose molecole segnale e proteine enzimatiche. Particolarmente interessanti ai fini della regolazione della progressione del ciclo cellulare, sono certamente la cascata di ERK e il pathway Jak/STAT.

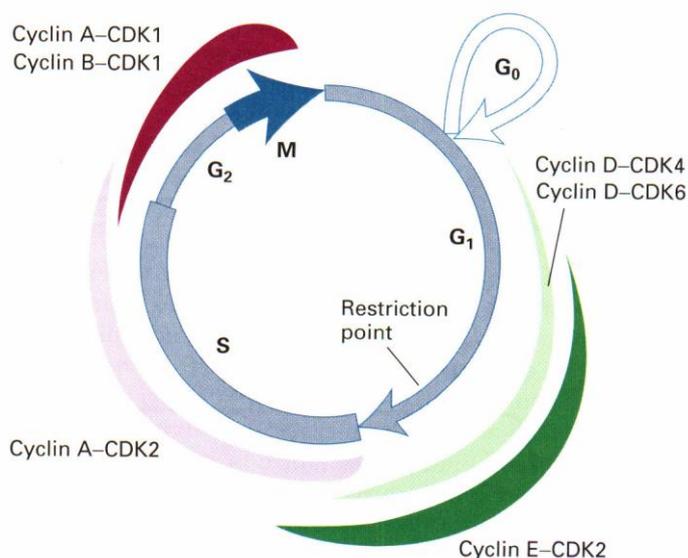


Figura 6. Rappresentazione schematica delle fasi che si susseguono nel ciclo cellulare, con i relativi complessi ciclina-CDK, in cellule di mammifero (da Lodish *et al.*, 2004).

3.1 La cascata di ERK

ERK1/2 (anche definite p42/p44 MAPK, rispettivamente) sono due isoforme delle chinasi regolate da segnali extracellulari (ERK) appartenenti alla famiglia delle proteine chinasi attivate da mitogeni (MAPK), che include ERK5, le chinasi N-terminali c-Jun (JNK 1/2/3) e le p38 MAP chinasi (p38 a,b,c,d). Questi enzimi sono attivati attraverso una cascata di fosforilazioni sequenziali che amplifica e trasduce segnali provenienti dalla membrana cellulare al nucleo (Fig. 7).

Dopo l'attivazione recettoriale, la piccola proteina Ras, legata al GTP e ancorata alla membrana, recluta una delle chinasi Raf, in un complesso in cui essa diventa attivata. In seguito, Raf fosforila due residui di serina delle protein chinasi MEK1 e MEK2 (anche dette MAP2K1 e MAP2K2, rispettivamente), che a loro volta attivano ERK1/2 mediante fosforilazioni sequenziali dei residui di treonina e tirosina

Introduzione

del motivo T-E-Y. Infine, le proteine ERK attivate regolano, mediante fosforilazione, molti target nucleari e citosolici che svolgono importanti funzioni biologiche (Ramos JW, 2008). A seconda della durata, dell'entità e della sua localizzazione subcellulare, l'attivazione di ERK controlla diverse risposte cellulari, come la proliferazione, la migrazione, il differenziamento e la morte cellulare (Murphy LO and Blenis J, 2006).

Il pathway Ras/Raf/ERK è spesso deregolato nelle patologie neoplastiche come risultato di mutazioni attivanti a carico di Ras o Raf, osservate in particolare nei melanomi maligni, tumori dell'intestino, del pancreas e della tiroide. Molti studi associano il potenziale oncogeno di questo pathway all'incremento della sopravvivenza cellulare, specialmente attraverso la stimolazione dell'attività di proteine antiapoptotiche, come Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, IAP, oppure reprimendo l'attività di proteine proapoptotiche, come Bad e Bim (Balmanno K and Cook SJ, 2009).

Paradossalmente, un numero crescente di indagini scientifiche suggerirebbero che, in alcune condizioni, l'attivazione aberrante di ERK possa, al contrario, promuovere la morte cellulare (Cagnol S and Chambard JC, 2009). In base allo stimolo e al tipo cellulare, l'attività di ERK potrebbe mediare diversi eventi antiproliferativi, come l'apoptosi, l'autofagia e la senescenza sia *in vitro* che *in vivo*. L'attività di ERK può essere in grado di stimolare sia il pathway apoptotico intrinseco sia quello estrinseco inducendo il rilascio del citocromo c mitocondriale o l'attivazione della caspasi 8, l'arresto del ciclo cellulare o la vacuolizzazione autofagica. La senescenza indotta dal pathway Ras/Raf/ERK è in genere correlata all'incremento dell'attività della β -galattosidasi e all'induzione dei classici geni associati alla senescenza, come p16/INK4A, p53, p21 e p14-p19/ARF.

Questi effetti atipici mediati da questo pathway richiedono che l'attività di ERK sia sostenuta in specifici compartimenti subcellulari e potrebbero dipendere dalla presenza di specie reattive dell'ossigeno.

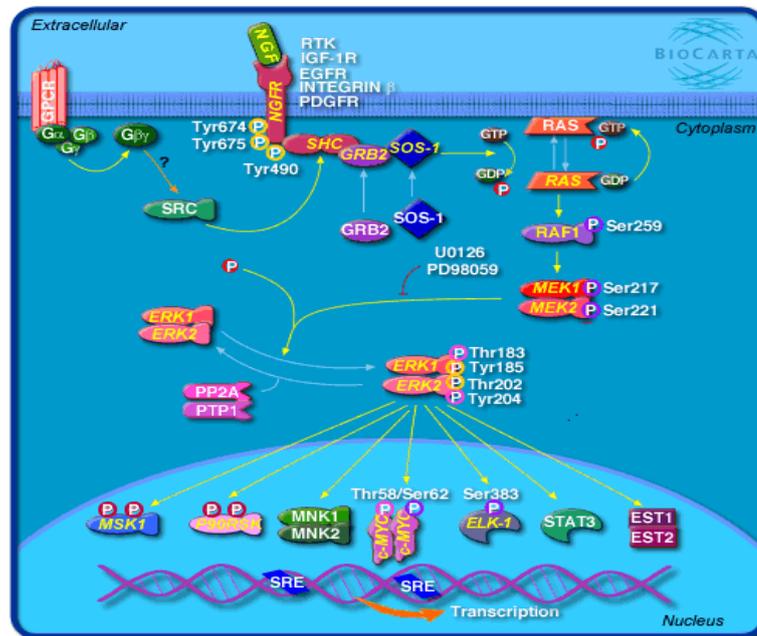


Figura 7. Via di trasduzione del segnale delle MAPK ERK 1/2.

3.2 Il fattore di trascrizione STAT3

Le proteine STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) sono fattori trascrizionali che vengono codificati nell'uomo dal gene *STAT3*.

Nel pathway di STAT3 (Fig. 8), l'attivazione di recettori di fattori di crescita e di citochine localizzati sulla superficie di membrana, induce la specifica fosforilazione in tirosina delle catene dei recettori stessi. Tale fosforilazione crea siti di aggancio per il reclutamento delle proteine STAT3 citosoliche latenti, che contengono domini SH-2 che riconoscono i siti di fosforilazione tirosinica. Dopo il reclutamento a livello dei recettori attivati, STAT3 viene attivato dalla fosforilazione di un singolo residuo di tirosina (Tyr705). La fosforilazione di STAT3 può essere catalizzata da attività tirosin chinasiche intrinseche del recettore attivato oppure da chinasi Janus (JAK) che si associano ai recettori attivati da citochine (Darnell JE, 1997). Le molecole fosforilate di STAT3 dimerizzano, mediante le reciproche interazioni intermolecolari tra i domini SH-2 e i siti di fosforilazione, e i dimeri traslocano nel nucleo. Nel nucleo i dimeri di STAT3 legano elementi del promotore di diversi geni target per regolare la loro trascrizione. Tra questi geni, le proteine STAT3 possono riconoscere un elemento conservato nel promotore di p21^{Waf1/Cip1} e aumentare l'espressione dell'mRNA di questo fattore responsabile della regolazione del ciclo cellulare (Chin Y *et al.*, 1996). STAT3 è richiesto anche per la regolazione di altri geni come c-myc, ciclina D1, Bcl-2, Bcl-xL e macroglobulina-2 (Bromberg J *et al.*, 1999; Bowman T *et al.*, 2000; Zhang X and Darnell JE, 2001; Yoo J *et al.*, 2001). Molti geni target di STAT3 sono, dunque, componenti chiave della regolazione della progressione del ciclo cellulare dalla fase G1 alla fase S. Difatti, l'attivazione di STAT3 è spesso associata alla crescita o alla trasformazione cellulare. Alcuni studi indicano che i fattori di trascrizione STAT3 inducono trasformazione cellulare e possono essere considerati come oncogeni. Linee cellulari tumorali o campioni ottenuti da neoplasie umane presentano spesso forme attivate di STAT3. Questo fattore è dunque considerato come un importante mediatore della proliferazione cellulare.

Introduzione

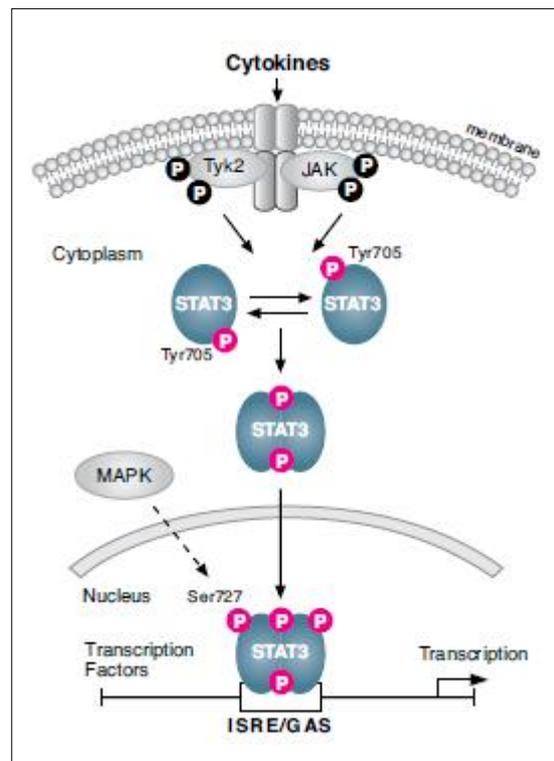
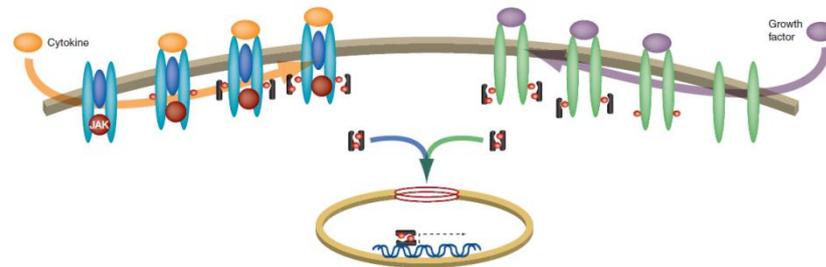


Figura 8. Attivazione recettoriale mediata da fattori di crescita (viola) e citochine (arancione) che porta all'attivazione e alla traslocazione nucleare di STAT3. (Johnston PA and Grandis JR, 2011).

L'attività trascrizionale di STAT3 sembra essere strettamente correlata alla fosforilazione della serina 727 (Ser 727) (Wen Z *et al.*, 1995; Yokogami K *et al.*, 2000). Questo sito di fosforilazione è localizzato all'interno di una sequenza consenso (Pro-Met-Ser-Pro) per i membri della famiglia delle MAP chinasi, incluso ERK (Wen *et al.*, 1995) (Fig. 8). Difatti, è stato dimostrato che STAT3 può essere fosforilato da ERK sulla serina 727 in risposta a fattori di crescita (Chung *et al.*, 1997).

3.3 p21^{Waf1/Cip1}: un regolatore negativo del ciclo cellulare

p21^{Waf1/Cip1} è un inibitore delle chinasi ciclina dipendenti (CDK) in grado di inibire la proliferazione cellulare attraverso due meccanismi che dipendono da due domini strutturali distinti: il dominio carbossi-terminale che lega PCNA (antigene nucleare della proliferazione cellulare) e il dominio ammino-terminale di inibizione dei complessi CDK-ciclina (Chen J *et al.*, 1995; Luo Y *et al.*, 1995).

Attraverso il legame a PCNA, p21 compete per il legame con la DNA polimerasi- δ e diverse altre proteine coinvolte nella sintesi del DNA, inibendo, perciò di conseguenza, la sintesi del DNA e la progressione del ciclo cellulare attraverso la fase S (Moldovan *et al.*, 2007).

p21 appartiene alla famiglia Cip e Kip di inibitori delle CDK che include p21, p27 e p57. Queste proteine inibiscono l'attività chinasi di numerose, ma non identiche, classi di complessi CDK-ciclina attraverso le proprie sequenze omologhe N-terminali. In particolare, p21 lega una specifica subunità della ciclina attraverso un motivo conservato Cy1 localizzato a livello della sua estremità N-terminale e attraverso un motivo ridondante Cy2 presente alla sua estremità C-terminale (Chen JM *et al.*, 1999). Inoltre, questa proteina inibisce l'attività CDK anche indirettamente, interferendo con la fosforilazione attivante di CDK1 e CDK2 (Smits VA *et al.*, 2000).

p21 inibisce la progressione del ciclo cellulare principalmente attraverso l'inibizione dell'attività di CDK2, che è richiesta non soltanto per la fosforilazione di RB con il conseguente rilascio e induzione dell'espressione genica E2F-dipendente, ma anche per l'attività di proteine direttamente coinvolte nella sintesi del DNA (Zhu W *et al.*, 2005). Sebbene questa attività sia svolta anche dagli altri inibitori delle CDK (p27 e p57), evidenze genetiche e biochimiche suggeriscono che essi possono avere ruoli distinti nella tumorigenesi (Besson A *et al.*, 2008). p21 costituisce l'inibitore centrale di CDK2, in risposta ad una varietà di segnali cellulari ed ambientali per promuovere attività di soppressione tumorale (Fig. 9).

Introduzione

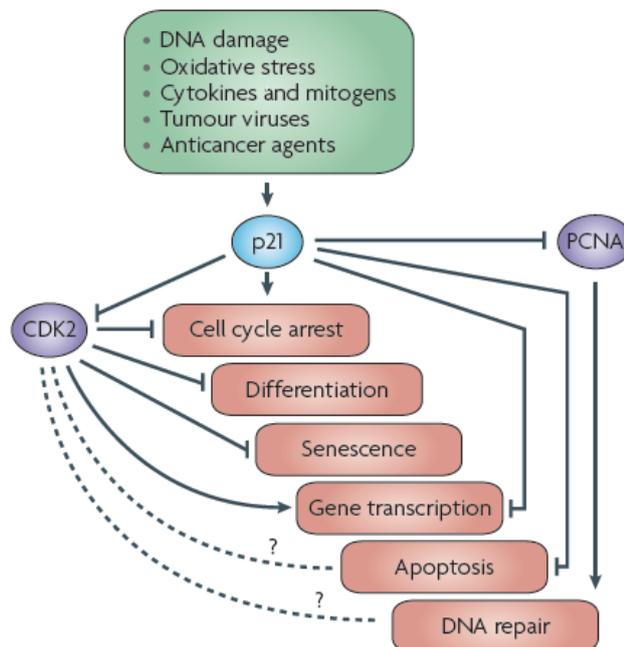


Figura 9. p21 risponde ad una varietà di stimoli per inibire la crescita cellulare, soprattutto attraverso l'inibizione dell'attività chinasi della chinasi ciclina-dipendente 2 (CDK2) (Abbas T and Dutta A, 2009).

p21 costituisce un target trascrizionale di p53 e gioca un ruolo cruciale nel mediare l'arresto della crescita quando le cellule sono esposte ad agenti che danneggiano il DNA come la doxorubicina e le radiazioni gamma (el-Deiry WS, *et al.*, 1993). E' stato dimostrato che l'aumento dell'espressione di p21 induce un arresto del ciclo cellulare nelle fasi G1, G2 o S (Radhakrishnan SK *et al.*, 2004). Al contrario, cellule p21-deficienti non riescono a bloccare il ciclo cellulare in risposta all'attivazione di p53 in seguito al danno al DNA (Waldman T *et al.*, 1995).

Oltre a p53, una varietà di altri fattori, inclusi Sp1/Sp3, Smads, Ap2, i trasduttori del segnale e attivatori di trascrizione (STAT), BRCA1, E2F-1/E2F-3, sono noti attivare la trascrizione di p21 (Gartel AL and Tyner AL, 1999). Oltre al loro ruolo in risposta al danno al DNA, p21 è anche implicato nel differenziamento terminale, nella senescenza replicativa e protezione da apoptosi p53-dipendente e -indipendente (Gartel AL and Tyner AL, 2002).

In realtà oltre alla regolazione trascrizionale, esistono altri meccanismi di regolazione dei livelli di p21 in una cellula, incluso il silenziamento epigenetico, la stabilità dell'mRNA, la degradazione ubiquitina-dipendente e -indipendente della proteina.

3.4 p53: il guardiano del genoma

Il soppressore tumorale p53 è una fosfoproteina nucleare dal peso molecolare di 53 kDa, codificata dal gene *TP53* localizzato sul braccio corto del cromosoma 17. La proteina p53 "wild type" contiene 393 amminoacidi ed è composta di diversi domini strutturali e funzionali. Essa appartiene ad un'unica famiglia di proteine che include tre membri: p53, p63 e p73. Sebbene queste proteine siano strutturalmente e funzionalmente correlate, p53 sembra essersi evoluta negli organismi superiori per prevenire lo sviluppo tumorale, mentre p63 e p73 presentano un ruolo importante nella normale biologia dello sviluppo (Irwin MS and Kaelin WG, 2001).

Come soppressore tumorale p53 risulta essenziale per prevenire una proliferazione cellulare inappropriata e mantenere l'integrità del genoma in seguito a stress genotossici (Vousden KH and Lu X, 2002). In seguito a vari stimoli intra ed extracellulari, come un danno al DNA (provocato da radiazioni ionizzanti, raggi UV, uso di farmaci citotossici o agenti chemioterapici o infezioni virali), uno shock termico, ipossia e l'overespressione di oncogeni (Fig. 10), p53 viene attivato e costituisce una proteina regolatoria in grado di innescare diverse risposte biologiche, sia a livello di singola cellula sia a livello dell'intero organismo.

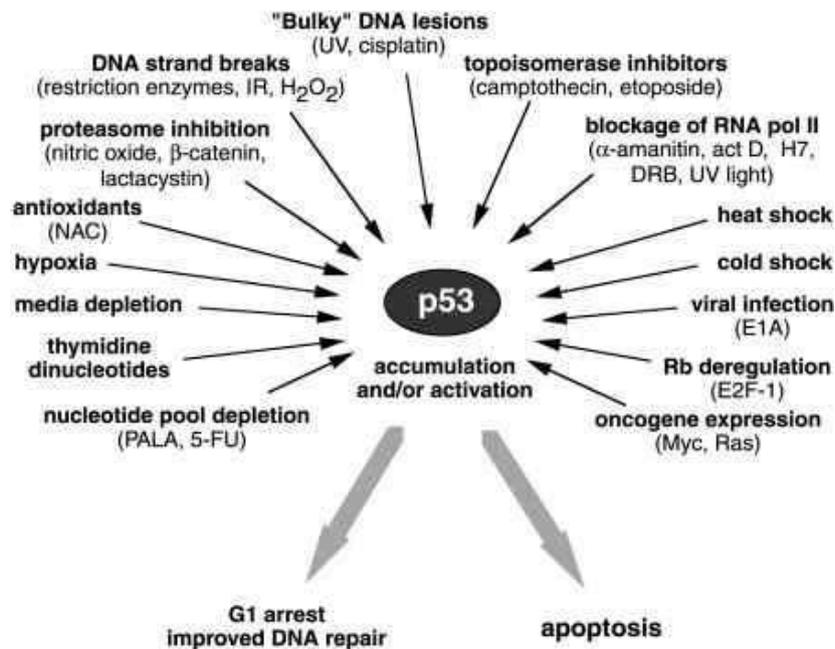


Figura 10. Schema degli stress attivanti p53. (Ljungam M, 2000).

Tra le diverse risposte cellulari indotte da p53, le più rilevanti sono certamente l'induzione del blocco del ciclo cellulare e dell'apoptosi. Sembra che la capacità di bloccare la crescita cellulare sia centrale per la sua funzione di soppressore

Introduzione

tumorale. p53 può indurre un blocco del ciclo cellulare nelle fasi G1, G2 e S (Agarwal ML *et al.*, 1995). L'induzione del blocco del ciclo cellulare nelle fasi G1 e G2 mediata da p53 fornisce il tempo alla cellula per riparare il danno genomico eventualmente subito prima di entrare negli stadi critici della sintesi del DNA e della mitosi. Le cellule bloccate possono tornare a proliferare grazie alle funzioni biochimiche di p53 che favoriscono la riparazione del DNA, incluse la riparazione con escissione di nucleotide e la riparazione con escissione di base (Zhou J *et al.*, 2001).

p21^{waf1/Cip1} è forse il target meglio conosciuto a valle di p53 e costituisce il principale mediatore del blocco del ciclo cellulare p53-dipendente in seguito a un danno del DNA. In risposta a stress cellulari, p53 up-regola i livelli endogeni dell'mRNA e della proteina di p21. Tuttavia, dobbiamo tenere presente che le vie mediate da p53 sono governate anche da altri prodotti genici target, come ad esempio, Gadd45 e 14-3-3δ, che prendono parte al blocco del ciclo in fase G2 (Hermeking H *et al.*, 1997; Zhan Q *et al.*, 1999).

CAPITOLO 4. Carcinoma mammario

4.1 Epidemiologia e biologia

Il carcinoma della mammella costituisce la neoplasia più frequente nelle donne dei Paesi industrializzati e rappresenta la principale causa di morbilità e mortalità oncologiche. L'incidenza del cancro della mammella presenta un'ampia variabilità geografica. E' quasi 10 volte più frequente nelle popolazioni ricche dell'Occidente rispetto alle aree del Terzo Mondo. È stato stimato che circa una su 8 donne negli Stati Uniti (circa il 12%) svilupperanno un tumore al seno di tipo invasivo nel corso della loro vita e la stima di incidenza per il 2014 è stata di circa 232.670 nuovi casi, insieme a 62.570 nuovi casi di forme non invasive (*in situ*) (breastcancer.org). Il carcinoma mammario costituisce la neoplasia più comune tra le donne statunitensi, ed è seconda al carcinoma polmonare come causa più frequente di morte legata al cancro. In Italia la stima è di circa 40.000 nuovi casi l'anno, in media con i valori europei. Non considerando i carcinomi cutanei, il carcinoma mammario è la neoplasia più diagnosticata nelle donne, in cui circa un tumore maligno ogni tre (29%) è un tumore mammario (Tabella 1).

	♂	♀	
Rango	Maschi	Femmine	Tutta la popolazione
1°	Prostata [20%]	Mammella [29%]	Colon-retto [14%]
2°	Polmone [15%]	Colon-retto [13%]	Mammella [13%]
3°	Colon-retto [14%]	Polmone [6%]	Prostata [11%]
4°	Vescica* [10%]	Tiroide [5%]	Polmone [11%]
5°	Stomaco [5%]	Utero corpo [5%]	Vescica [7%]

Tabella 1. Primi cinque tumori più frequentemente diagnosticati e proporzione sul totale dei tumori (esclusi i carcinomi della cute) per sesso. Pool Airtum 2007-2010.

Considerando le frequenze nelle varie fasce d'età, il cancro della mammella rappresenta il tumore più frequentemente diagnosticato tra le donne sia nella fascia d'età 0-49 anni (41%), sia nella classe d'età 50-69 anni (35%), sia in quella più anziana ≥70 anni (21%).

A livello della mammella possono insorgere diversi tipi di tumore ma, nella stragrande maggioranza dei casi, si tratta di tumori epiteliali, cioè di carcinomi, mentre rari sono i sarcomi ed i tumori di origine connettivale. Il carcinoma della mammella è provocato da una crescita abnorme delle cellule che rivestono i dotti ed i lobuli della ghiandola ed è classificato in base alla cellula di origine (duttale o lobulare), alla invasione (diffusione e crescita) attraverso il dotto o il lobulo e dall'aspetto istologico (Fig. 11).

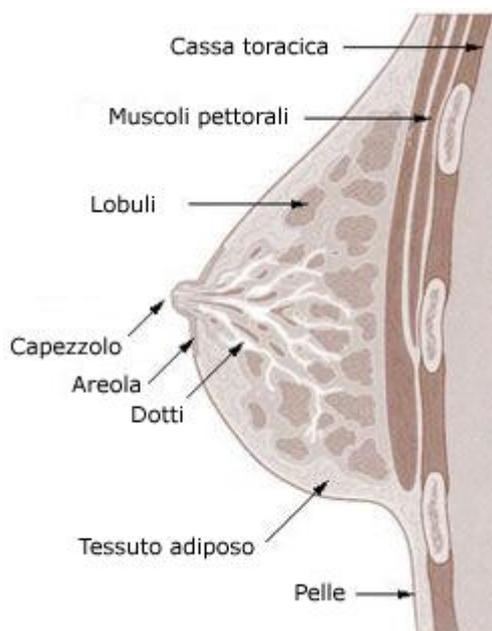


Figura 11. Struttura della mammella femminile.

Sono stati individuati vari geni che possono essere oggetto di mutazioni somatiche o germinali nel cancro della mammella, tra cui geni che codificano per il recettore degli estrogeni (ER) e del progesterone (PR), per il recettore del fattore di crescita epidermico EGF (ErbB2 o HER-2), per p53, BRCA1 e BRCA2.

Sia gli estrogeni che il progesterone sono necessari per il normale sviluppo della mammella. PGR è un gene regolato dagli estrogeni, avendo nel suo promotore un elemento sensibile ad essi; inoltre in generale le neoplasie della mammella positive per ER lo sono anche per PGR (Humpreys RC *et al.*, 1997). Molti tumori maligni della mammella sono dipendenti dagli estrogeni per la loro crescita e la loro sopravvivenza. Questo effetto è mediato da ER, un fattore di trascrizione nucleare che ha come ligandi gli estrogeni, i quali inducono la formazione di un omodimero in grado di attivare i promotori di diversi geni (incluso PGR), i quali a loro volta inducono la proliferazione delle cellule e conferiscono resistenza all'apoptosi. Il ruolo del progesterone nella carcinogenesi mammaria, invece, è sostenuta dal fatto che la proliferazione dell'epitelio mammario è maggiore in fase luteale, con un picco 9-10 giorni dopo l'ovulazione, cui corrisponde l'aumento di attività mitotica in particolar modo a livello dell'unità termino-lobulare, dove originano la maggior parte dei carcinomi. Inoltre, la terapia sostitutiva con estro-progestinici aumenta il rischio di sviluppare un carcinoma mammario in misura superiore rispetto a quella con soli estrogeni.

ErbB2 appartiene ad una famiglia di quattro recettori di fattori di crescita che comprende ErbB1, più noto come EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), ErbB3 (HER3) e ErbB4 (HER4). I fattori di crescita che legano questi recettori sono conosciuti come "hereguline" o "neureguline", ed il loro legame con ErbB3 e ErbB4

induce una eterodimerizzazione con ErbB2 e successiva trasduzione a valle di un segnale che porta alla divisione cellulare. L'amplificazione di ErbB2 e l'iperespressione della relativa proteina sono riscontrati nel 20-30% dei tumori della mammella e sono associati ad un decorso clinico sfavorevole ed a diminuzione del tempo di sopravvivenza (Ross JS and Fletcher JA, 1998; Baselga J and Arteaga CL, 2005).

Dal 5 al 10% dei carcinomi mammari compaiono come risultato di specifiche mutazioni in geni ad alta penetranza. Circa la metà di tali mutazioni, trasmesse con eredità mendeliana autosomica dominante, sono relative ai geni oncosoppressori BRCA1 (cromosoma 17q21) e BRCA2 (cromosoma 13q13); essi sono responsabili dell'80-90% delle neoplasie geneticamente determinate, codificando proteine nucleari implicate nei meccanismi biochimici che controllano l'integrità del genoma. Questi geni rappresentano i più forti predittori di rischio attualmente noti e conferiscono un aumentato rischio di neoplasia mammaria, a esordio spesso bilaterale, in età più precoce rispetto alla popolazione generale (Peto J *et al.*, 1999; Chen S and Parmigiani G, 2007).

Alcune sindromi familiari si associano ad aumentata suscettibilità di carcinoma mammario, nell'ambito di malattie complesse con neoplasie multiple. Per alcune di esse è stata identificata la mutazione genica coinvolta: una mutazione di p53 nella Sindrome di Li Fraumeni, del gene *PTEN* nella Sindrome di Cowden e del gene *AT* nella Sindrome atassia-teleangectasia.

Mutazioni relativamente comuni a livello di geni a bassa penetranza agiscono insieme a fattori endogeni e a condizioni legate allo stile di vita nell'insorgenza di neoplasie sporadiche, che rappresentano la maggior parte dei carcinomi mammari.

4.2 Linee cellulari come modelli di neoplasie mammarie

Buona parte delle nostre conoscenze sulla biologia del tumore mammario è dovuta a studi *in vivo* o *in vitro* condotti con linee cellulari di carcinoma mammario (BCC, *Breast Cancer Cell*). Queste ultime forniscono una fonte illimitata di materiale omogeneo auto-replicante, privo di contaminazioni da parte di cellule stromali, e spesso facilmente coltivabili in semplici mezzi standard. La prima linea descritta, BT-20, fu introdotta nel 1958 (Lasfargues EY and Ozzello L, 1958). Da allora, e nonostante il consistente lavoro in questo ambito, il numero di linee immortalizzate ottenute è stato sorprendentemente basso (circa 100). Infatti, i tentativi di coltivare BCC derivate da tumori primari sono stati in buona parte inutili. Questa scarsa efficienza era spesso dovuta alle difficoltà tecniche nell'estrazione di cellule tumorali vitali dal loro stroma circostante. Molte delle linee BCC vitali sono, infatti, ottenute da tumori metastatici (principalmente da effusioni pleuriche). Le effusioni forniscono generalmente un gran numero di cellule tumorali vitali e dissociate, con poche o prive di contaminazioni da fibroblasti o da altre cellule tumorali dello stroma.

Gran parte delle linee BCC oggi più utilizzate sono state caratterizzate soltanto nel 1970 e sono considerate rappresentative dei tumori da cui sono state originate. Alcune di quelle più utilizzate includono: MCF-7, T-47D, BT-474, SK-BR-3, MDA-MB-231, ZR-75-1, Hs578T. Esse si distinguono per alcuni aspetti riguardanti la loro biologia o la loro origine. Ad esempio nelle BT-20 il recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR) risulta over-espresso (De Fazio A *et al.*, 2000). Nelle BT-474 e nelle SK-BR-3 risulta invece amplificato *ERBB2* (codifica Her-2/neu) (Järvinen TA *et*

al., 2000; Kauraniemi P *et al.*, 2001). Le cellule ZR-75-1 sono state isolate dal liquido ascitico (Engel LW *et al.*, 1978) e non da effusioni pleuriche come la maggior parte delle altre linee cellulari di carcinoma mammario.

Per la classificazione e il confronto delle linee cellulari BCC (e dei tumori mammari), nessun criterio sembra a priori più pertinente di quello basato sull'espressione del recettore degli estrogeni (ER). Come mediatore dell'azione degli ormoni estrogenici, esso gioca un ruolo centrale nella biologia e nel trattamento del carcinoma mammario. Una delle principali proteine indotte dagli estrogeni è rappresentata dal recettore del progesterone (PGR). I livelli di ER e PGR sono stati valutati nei tumori e nelle linee cellulari per più di 30 anni (Leclercq G, 2002). I dati accumulati hanno rivelato che i recettori steroidei sono distribuiti nei tumori al seno nel seguente modo: 50-60% ER+/PGR+; 10-20% ER+/PGR-; 5-15%ER-/PGR+; 15-25% ER-/PGR- (Lacroix M and Leclercq G, 2004). Al contrario, le linee BCC sono caratterizzate da una distribuzione chiaramente differente: il 20% sono ER+/PgR+; il 7% ER+/PgR-; il 5% ER-/PgR+; il 68% ER-/PgR- (Lacroix M and Leclercq G, 2004). Una spiegazione di queste discrepanze suppone che le linee BCC negative per i recettori degli steroidi siano più facili da estrarre e da mantenere *in vitro* rispetto a quelle positive per tali recettori.

Di recente, un altro tipo di classificazione si basa sulla cosiddetta ipotesi della "transizione epitelio-mesenchimale" (EMT). Secondo tale teoria, durante la progressione sequenziale *in vivo* del processo neoplastico, da iper-proliferazione atipica allo stadio metastatico, le cellule mammarie tumorali potrebbero subire alterazioni fenotipiche, sostenute o meno da mutazioni geniche. Queste alterazioni potrebbero, in particolare, includere la perdita, in misura variabile, delle caratteristiche "epithelial-like", e l'acquisizione di tratti più invasivi e aggressivi "mesenchymal-like". Questo concetto di cambiamento fenotipico nelle BCC si oppone all'idea che il profilo delle cellule tumorali resti essenzialmente lo stesso durante la progressione tumorale. L'ipotesi EMT è stata principalmente basata su studi che hanno coinvolto un numero relativamente alto (più di 18) di linee BCC. È stato evidenziato che esse risulterebbero distribuite, lungo uno spettro di differenziazione, da un aspetto epiteliale ad un aspetto mesenchimale (Sommers CL *et al.*, 1994).

In base al proprio fenotipo ed invasività, le linee cellulari possono essere grosso modo suddivise in tre gruppi:

- Il primo gruppo comprende cellule che esprimono un'ampia gamma di marker tipici del fenotipo dell'epitelio luminale: ER, E-caderine (gene *CDH1*), giunzioni strette (zonula occludens-1, TJP1), desmoplakin I/II (DSP), gli ultimi tre coinvolti nella costituzione delle giunzioni aderenti, delle giunzioni strette e dei desmosomi, rispettivamente. Queste cellule "luminal epithelial-like" crescono come colonie interconnesse di cellule poligonali su plastica e come colonie fuse su matrici in gel. Esse sono debolmente invasive. Le linee cellulari incluse in questo gruppo comprendono, ad esempio, le MCF-7 (Fig. 12A), le T-47D e le ZR-75 (Fig. 12B).

- Il secondo gruppo di linee cellulari, strettamente correlato al primo, sarebbe caratterizzato da un fenotipo "weakly luminal epithelial-like", con l'espressione, in misura minore, solo di alcuni marker epitelioidi trovati nel primo gruppo e da una scarsa invasività *in vitro*. Molte di queste linee cellulari crescono come sfere non fuse in matrici gelatinose. Sulla plastica, esse si aggregano in cluster di cellule debolmente attaccate che raggiungono solo raramente la completa confluenza. In questo gruppo sono incluse le BT-474 e le SK-BR-3 (Fig. 12C).

- Il terzo gruppo di linee cellulari risulta nettamente distinto dagli altri due. Esso non esprime i marker epitelioidi evidenziati nei gruppi "luminal-epithelial-like" e "weakly luminal epithelial-like", ma al contrario produce un elevato livello di vimentina

Introduzione

(gene *VIM*), una proteina molto espressa anche nelle cellule mesenchimali. Molte di queste linee hanno fenotipo fibroblastoide sulla plastica e crescono come colonie con ampie proiezioni stellate in matrici gelatinose. Esse sono altamente invasive *in vitro*. Le linee BCC appartenenti a questo gruppo “mesenchymal-like” o “stromal-like” includono le MDA-MB-231 e le Hs578T.

Un altro modello che è stato, e viene ancora oggi, ampiamente utilizzato per lo studio dei meccanismi molecolari alla base dello sviluppo e dell'evoluzione del carcinoma mammario, è rappresentato dalle linee cellulari MCF-10 (So JY *et al.*, 2012). Si tratta di una serie di linee cellulari tutte originate a partire dalle cellule mammarie MCF-10A epiteliali umane (Fig. 12D). Queste linee cellulari possiedono lo stesso background genetico e offrono un modello unico per lo studio della progressione del carcinoma mammario in un sistema di colture cellulari. Le MCF-10A sono cellule immortalizzate spontaneamente, non maligne, ottenute da pazienti con malattia fibrocistica del seno (Dawson PJ *et al.*, 1996). Sono considerate come cellule normali in quanto non mostrano alcun carattere invasivo e non formano tumori quando trapiantate in topi immunodeficienti.

Dunque, la gamma di linee cellulari di carcinoma mammario disponibili può potenzialmente consentire lo studio dei meccanismi alla base dell'insorgenza e dell'evoluzione di questo tipo di tumore nell'uomo. Tuttavia, il fatto che queste cellule possano effettivamente rappresentare il tumore da cui esse derivano, è stato a lungo argomento di discussione. Ad esempio, era giusto credere che una singola linea potesse accuratamente rappresentare ogni cellula cancerosa presente nel tumore da cui essa è stata originata, in ogni step della sua progressione? E' abbastanza diffusa l'idea che i tumori della mammella siano molto eterogenei. Tuttavia, molti dati relativi alla natura genetica e fenotipica (grado, marker espressi) indicano che il profilo di un tumore non subisce notevoli alterazioni durante la sua progressione. Piuttosto, al contrario, le sue componenti *in situ* e invasive sembrano essere molto simili, e questa similarità è stata anche più volte ritrovata nelle metastasi, a prescindere dalla loro localizzazione, e nelle recidive. Infatti, in ogni step della loro progressione, i tumori mammari possono essere visti come collezioni di sottopopolazioni cellulari che mostrano lo stesso pattern generale di gravi alterazioni genetiche ricorrenti e che condividono le stesse caratteristiche fenotipiche principali. Dunque, in base a questo, è possibile affermare che le BCC estratte da tessuto tumorale, o anche da metastasi, possono essere considerate, al momento del loro isolamento, come cellule che mantengono le principali caratteristiche di tutte le cellule tumorali *in vivo* (Lacroix M and Leclercq G, 2004).

Siccome le BCC appena isolate possono essere considerate come rappresentative delle BCC *in vivo*, si potrebbe pensare che la loro coltura prolungata in condizioni artificiali *in vitro* possa modificare le loro proprietà. In realtà, l'evoluzione delle linee BCC è raramente accoppiata a profonde modificazioni genetiche/fenotipiche. Per di più esempi di EMT *in vitro* sono rari, e tentativi di ottenere cellule ER- da BCC ER+ sono stati in gran parte senza successo. Dunque, *in vivo* come *in vitro*, le principali caratteristiche delle BCC sembrano essere intangibili e mantenute nel tempo.

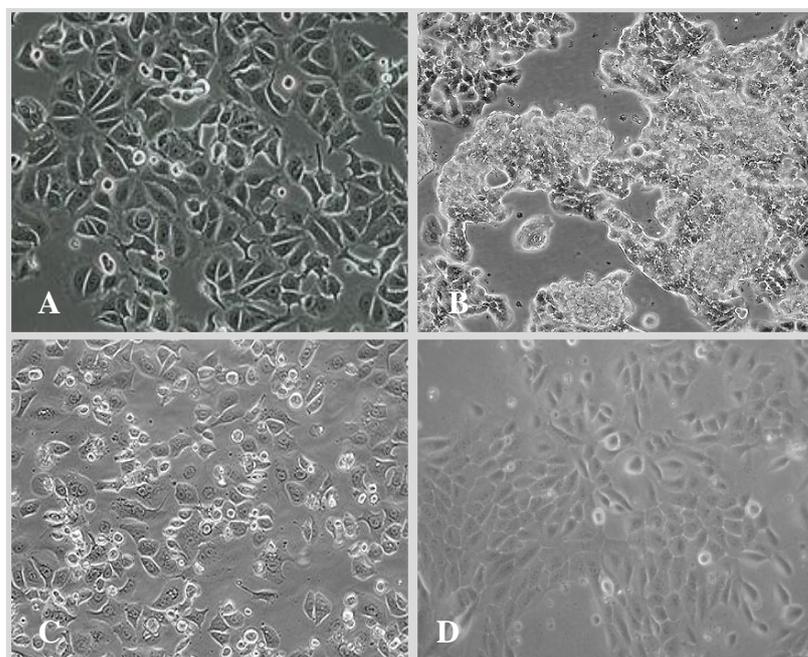


Figura 12. Linee cellulari mammarie MCF-7 (A), ZR-75-1 (B), SK-BR-3 (C) e MCF-10A (D).

CAPITOLO 5. Scopo della tesi

La capacità dimostrata dagli acidi grassi polinsaturi della serie Omega 3 di promuovere diverse attività cellulari e molecolari capaci di incidere sull'andamento di importanti processi quali l'infiammazione, la vitalità e la crescita cellulare, la trasduzione di segnali intracellulari, l'espressione genica e molti altri, ha certamente suggerito un potenziale ruolo di questi nutrienti nei processi di carcinogenesi e di progressione tumorale.

Di recente, dunque, molti studi stanno rivolgendo attenzione al coinvolgimento degli n-3 PUFA nell'eziologia delle patologie neoplastiche sia attraverso l'impiego di modelli *in vivo* che *in vitro* (Rose DP and Connolly JM, 1999; Cockbain AJ et al., 2012). Tuttavia, il dibattito sull'effettivo ruolo benefico degli Omega 3 nella prevenzione delle patologie cancerose resta ancora piuttosto aperto.

Difatti, i dati epidemiologici della potenziale associazione tra il consumo di Omega 3 e il rischio di diversi tipi di tumori risultano insufficienti o comunque poco chiari (Gerber M, 2012; Shen XJ et al., 2012; Ibiebele TI et al., 2012; Wallingford SC et al., 2013; Noel SE et al., 2014; Song M et al., 2014; Crowe FL et al., 2014). D'altra parte, queste ricerche sembrano in contrasto con le numerose evidenze di laboratorio della capacità degli n-3 di influenzare i processi di differenziamento e sviluppo neoplastico (Liu G. et al., 2001; Berquin IM et al., 2007; Wang S et al., 2012; Laviano A et al., 2013; Merendino N et al., 2013).

Con l'eccezione di pochi studi (Dahm CC et al., 2012; Brasky et al., 2013), nel loro insieme, tutte queste ricerche suggeriscono un ruolo positivo degli Omega 3 nello sviluppo delle patologie neoplastiche. Restano da comprendere (i) i meccanismi molecolari alla base di tali effetti, (ii) se questi meccanismi siano gli stessi per ogni tipo di tumore o caso clinico considerato o (iii) se possano variare a seconda della natura del microambiente tumorale o delle sue caratteristiche biochimiche, molecolari e fenotipiche.

Tenendo presente tutto questo background, lo scopo di questo lavoro di tesi è stato quello di approfondire le basi degli effetti anti-tumorali degli Omega 3, impiegando una linea sperimentale basata sulla valutazione della capacità di questi composti (in particolare del DHA) di influenzare diversi processi cellulari e sul confronto delle risposte ottenute non in uno solo, ma a livello di più modelli cellulari. Abbiamo supposto che tale tipo di approccio avrebbe consentito non solo di ottenere evidenze più chiare dell'effettivo coinvolgimento di questi nutrienti nelle basi molecolari delle patologie neoplastiche, ma anche di individuare i loro specifici meccanismi d'azione nonché i fattori biologici attraverso i quali sono in grado di manifestare i propri effetti.

Abbiamo deciso di concentrarci sul carcinoma mammario in quanto costituisce la più diffusa patologia neoplastica tra le donne nel mondo, con una stima di circa un milione di nuovi casi l'anno. Inoltre, diverse indagini epidemiologiche e sperimentali avrebbero suggerito che gli acidi grassi della dieta, soprattutto gli Omega 3 EPA e DHA, siano in grado di influenzare con esito positivo lo sviluppo e la successiva evoluzione di tale neoplasia. Tuttavia, l'effettivo ruolo di questi di questi composti nell'eziologia del carcinoma mammario non è stato ancora del tutto chiarito.

Dunque, a tale scopo, sono state selezionate una serie di linee cellulari derivate dallo stesso tipo di tessuto, l'epitelio mammario, ma allo stesso tempo tutte dotate di diverse caratteristiche biochimico-molecolari e diverso grado di trasformazione. Ad esempio, le cellule MCF-10A sono una linea cellulare epiteliale mammaria immortalizzata ma non cancerosa, che presentano le caratteristiche

Scopo della tesi

tipiche delle cellule duttali lumentali ed esprimono gli antigeni specifici del tessuto mammario. Le MCF-7, SK-BR-3 e ZR-75-1 sono, invece, linee cellulari derivate da carcinoma mammario, dotate di proprietà fenotipiche e biomolecolari che permettono di considerarle come modelli di studio *in vitro* diversi.

CAPITOLO 6. Materiali e metodi

6.1 Linee cellulari e mezzi di coltura

Le linee cellulari utilizzate in questo studio sono state:

- MCF-10A (Soule HD *et al.*, 1990): cellule epiteliali mammarie umane immortalizzate;
- MCF-7 (Soule HD *et al.*, 1973): cellule di adenocarcinoma mammario umano;
- SK-BR-3 (Trempe GL, 1976): cellule di adenocarcinoma mammario umano;
- ZR-75-1 (Engel LW *et al.*, 1978): cellule di carcinoma duttale mammario umano.

Le cellule non tumorali sono state coltivate in DMEM/F12 Medium con aggiunta di siero di cavallo 5% (HS), penicillina/streptomina 1%, idrocortisone 0,5 µg/ml, tossina colerica 100 ng/ml, insulina 10 µg/ml ed EGF 20 ng/ml.

Le cellule neoplastiche sono state coltivate in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) con aggiunta di siero bovino fetale (FBS) 10% ed una miscela penicillina/streptomina 1%.

Le altre soluzioni necessarie per il mantenimento in coltura delle linee cellulari sono state:

- PBS 1X (Dulbecco's phosphate buffered saline), soluzione salina tamponata con fosfato, priva di Calcio e Magnesio, pH 7,4 contenente 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄.
- Tripsina-EDTA: 500 mg/L tripsina (1:250), 200 mg/L EDTA in PBS, pH 7,4.

- Crescita delle linee cellulari eucariotiche

Per il mantenimento in coltura, le cellule eucariotiche, scongelate rapidamente a 37°C, sono state, ogni volta, risospese in mezzo completo fresco e coltivate in piastre di plastica per colture cellulari. Sono state mantenute in incubatore alla temperatura di 37°C in un'atmosfera al 5% di CO₂ ed al 95% di aria ad umidità relativa del 90%.

- Propagazione delle cellule in coltura

Per la propagazione delle diverse linee cellulari, ogni volta, da piastre di cellule subconfluenti è stato rimosso il mezzo di coltura, è stato effettuato un lavaggio con PBS 1X ed è stata aggiunta tripsina-EDTA, che lasciata agire per 5 minuti a temperatura ambiente, permette alle cellule di staccarsi dalla piastra. È stato aggiunto il mezzo completo per neutralizzare l'effetto della tripsina, è stato raccolto il tutto e lo si è centrifugato a 240 g per 5 minuti a temperatura ambiente. Dopo la centrifugazione è stato rimosso il soprannatante e risospeso in mezzo di coltura completo fresco. Si è proceduto alla semina delle cellule in nuove piastre.

- Congelamento delle cellule

Per il congelamento, ogni volta le cellule, staccate e centrifugate, sono state risospese in una quantità opportuna di mezzo completo a cui è stato aggiunto il 5% (7,5% per le MCF-10A) di DMSO (Dimetilsolfossido). Le cellule sono state poi

aliquotate in tubi adattati al congelamento, congelate a -80°C e in seguito conservate in azoto liquido.

6.2 Preparazione delle sostanze da somministrare

- Preparazione dell'acido docosaesaenoico

Il DHA (Sigma) è stato solubilizzato in etanolo assoluto in modo da ottenere una preparazione 10 mM. La soluzione è stata aliquotata e chiusa sotto corrente di azoto (per evitare che l'ossigeno ossidi i doppi legami dell'acido grasso) e conservata a -20°C .

- Preparazione della BSA (Bovine Serum Albumin) fatty acid-free

La BSA è stata usata per la somministrazione del DHA, in quanto ne veicola le molecole rendendole maggiormente biodisponibili. Il rapporto è di 2 moli di DHA per ogni mole di BSA. La BSA (Sigma) è stata sciolta in una soluzione NaCl 0,9% in modo da ottenere una concentrazione pari a 5 mM, filtrata con filtri sterili da $0.45\ \mu\text{m}$ (Millipore Millex HA). È stata valutata l'eventuale perdita di BSA mediante il saggio di determinazione proteica Bradford (BIO-RAD) eseguito sul filtrato e sulla soluzione madre. La soluzione è stata aliquotata e conservata a -20°C .

6.3 Saggio MTT di vitalità cellulare

Il saggio con MTT (bromuro di dimetil-tiazolil-difenil-tetrazolio) (Sigma) è un test colorimetrico quantitativo. Il saggio si basa sulla capacità degli enzimi succinato deidrogenasi mitocondriali, presenti nelle cellule vitali, di trasformare il sale MTT tetrazolium 3-(4,5-dimethylthiazolo-2-yl)-2,5-diphenyltetrasolium bromide, di color giallo, in cristalli di formazano, mediante rottura dell'anello tetrazolico. I cristalli hanno una colorazione porpora e sono insolubili in soluzioni acquose. I cristalli ridisciolti in DMSO formano una soluzione purpurea misurabile spettrofotometricamente a 490 nm. I valori di assorbanza sono proporzionali alla quantità di formazano prodotta e, quindi all'attività metabolica e alla vitalità cellulare.

Questo test fornisce un'indicazione relativa della popolazione vitale e permette di valutare la tossicità di una sostanza, attraverso il confronto tra i valori di vitalità cellulare ottenuti dalle cellule trattate rispetto ai controlli.

Tutte le linee cellulari sono state seminate in piastre da 96 pozzetti ad una densità di 8.000-10.000 cellule/pozzetto. Dopo 24 ore di incubazione a 37°C , le cellule sono state trattate con due concentrazioni di DHA (100 e 300 μM) in mezzo al 5% FBS per 24, 48 e 72 ore. Il sale MTT è stato sciolto in PBS 1X alla concentrazione finale di 1 mg/ml. Alla scadenza del tempo sperimentale, in ciascun pozzetto è stato rimosso il mezzo utilizzato per il trattamento e sono stati aggiunti 100 μl della soluzione contenente MTT. La piastra è stata incubata a 37°C e 5% di CO_2 . Dopo due ore di incubazione, la soluzione contenente l'MTT in eccesso è stata allontanata e i cristalli di formazano adesi sul fondo sono stati sciolti con DMSO. Il monostrato cellulare è stato lavato 2 volte con PBS 1X e quindi incubato in 60 μl di dimetilsolfossido (Sigma). Infine l'assorbanza è stata misurata con uno spettrofotometro per piastre alla lunghezza d'onda di 490 nm. Il test è stato condotto

su almeno 5 replicati tecnici e 3 replicati biologici. La significatività statistica è stata calcolata mediante t_{student} test.

6.4 Analisi citofluorimetriche

Le analisi citofluorimetriche sono state condotte utilizzando lo strumento BD FACSCalibur™ (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Il contenuto cellulare di DNA è stato valutato mediante colorazione con propidio ioduro (PI).

Dopo 24 ore dalla semina, le cellule sono state trattate con DHA 100 e 300 µM per 24, 48 e 72 ore. Alla fine del trattamento da ciascun campione è stato rimosso il mezzo e inserito negli appositi tubi da FACS. Le cellule adese sono state staccate con Tripsina-EDTA, che è stata lasciata agire per circa 5 minuti a temperatura ambiente. Le cellule sono state riprese con mezzo completo e centrifugate a 1800 rpm per 5 minuti. Terminata la centrifugazione, è stato rimosso il surnatante, il pellet è stato risospeso con lo stesso mezzo di coltura recuperato in precedenza e così trasferito negli appositi tubi. Alla sospensione è stato aggiunto PI 25 µg/µl ed è stata poi lasciata a 4°C a riparo dalla luce per 30 minuti. È stata poi eseguita la lettura al citometro a flusso. Le percentuali di elementi nella regione di ipodiploidia e nelle fasi G0/G1, S e G2/M del ciclo cellulare sono state calcolate utilizzando i software CellQuest e MODFIT, rispettivamente. Le analisi sono state condotte su almeno 2 replicati tecnici e 3 replicati biologici.

- Composizione della soluzione di PI

Per 50 ml di soluzione sono stati utilizzati:

2,5 ml di una soluzione di Ioduro di Propidio 1 mg/ml

2,2 ml di Sodio Citrato 0,75 M

0,5 ml TRITON 10%

44,8 ml di acqua mQ

6.5 Estrazione delle proteine

Dopo aver allontanato il mezzo, sono stati effettuati due lavaggi con PBS 1X. In ogni pozzetto è stato aggiunto un opportuno volume di tampone di lisi cellulare RIPA Buffer ed incubato sul ghiaccio per 15 minuti. Di seguito, con lo scraper le cellule sono state staccate dal fondo della piastra e raccolte in tubi da microfuge (Eppendorf) centrifugate a 12000 rpm per 15 minuti a 4°C. Il surnatante è stato allontanato e conservato a -80°C.

- Composizione del Ripa-Buffer

Tris/HCl 50mM (Sigma), NaCl 150 mM, inibitori di proteasi (Aprotinina 10 µg/ml, PMSF 1 mM, Leupeptina 10 µg/ml), NaVO₄ 2 mM, EDTA 4 mM (Sigma), NaF 10 mM, Na Pirofosfato 10 mM, NP-40 (IGEPAL) 1%, Na deossicolato 0,1%.

6.6 Western Blotting

- Elettroforesi su gel di poliacrilammide con sodio dodecilsolfato

I campioni proteici sono stati bolliti per 5 minuti in un tampone (Sample-Buffer) contenente SDS (Sodio Dodecilsolfato)(Sigma), β -mercaptoetanololo (Sigma) ed il colorante blu di bromofenolo (Biorad).

La separazione elettroforetica è stata condotta a 30 mA ad Amperaggio costante per circa 1 ora su gel di poliacrilammide (Mini PROTEAN 3 Biorad.).

- Elettroblotting

È stata applicata una corrente di 100 V per 1 ora. Dopo la corsa, per verificare la presenza delle proteine sulla membrana (Amersham), essa è stata immersa in una soluzione di Rosso Ponceau (Sigma) e lavata con acqua.

- Rivelazione delle proteine

Il blot è stato incubato in una soluzione di latte in polvere senza grassi (MILK Non-fat Dry, BIO-RAD). Successivamente il blot è stato incubato con un anticorpo primario. Sono stati effettuati 3 lavaggi con TBS-TWEEN 0,1% v/v per dieci minuti ciascuno e in seguito incubazione con un anticorpo secondario (anti-mouse o anti-rabbit) legato ad un enzima, la perossidasi di rafano. Sono stati ripetuti i 3 lavaggi con TBS-TWEEN 0,1% per dieci minuti ed è stato applicato ECL (Enhanced ChemiLuminescence, metodo della chemiluminescenza intensificata, Amersham). La luce emessa è stata infine rilevata esponendo il blot ad una lastra fotografica.

- Running gel

Acqua milliQ, 30% acrilammide (Biorad), 1,5 M Tris pH 8,8, 10% SDS (Sigma), 10% APS (Ammonio persolfato), TEMED (Biorad)

- Stacking gel

Acqua milliQ, 30% acrilammide (Biorad), 1,0 M Tris pH 6,8, 10% SDS (Sigma), 10% APS, TEMED (Biorad).

- Transfer buffer

10% TGS (Tris-Glycine-SDS) 1X, 20% metanolo (Fluka).

Il protocollo base è stato ottimizzato per ogni specifico target proteico.

- Procedura per pERK 1/2, ERK1/2, pSTAT3 e STAT3

- Gel di poliacrilammide 10%, 1,5 mm di spessore;
- Dopo il trasferimento, saturazione con Milk 5% in un tampone TBS-TWEEN, 1 ora a temperatura ambiente;

Materiali e metodi

- Incubazione per tutta la notte con AB 1° (Cell Signaling e Santa Cruz) in BSA o Milk 5% in un tampone TBS-TWEEN, diluizione 1:500-1:1.000 a 4°C;
- 3 lavaggi con TBS-TWEEN 0,1% per 10 minuti a temperatura ambiente;
- Incubazione con AB 2° (anti-rabbit Jackson Immuno Research) in Milk 5% in un tampone TBS-TWEEN, diluizione 1:10.000, 1 ora a temperatura ambiente;
- 3 lavaggi con TBS-TWEEN 0,1% per 10 minuti a temperatura ambiente;
- Il blot è stato asciugato su carta 3M e bagnato per 1 minuto con ECL,
- Il blot è stato poi sistemato nella cassetta con la lastra a vari tempi (1-5-30 minuti), e la lastra, infine, è stata esposta 1 minuto nel liquido di sviluppo ed 1 minuto nel liquido di fissaggio.

- Procedura per p21^{Waf1/Cip1} e p53

- Gel di poliacrilammide 12%, 1,5 mm di spessore;
- Dopo il trasferimento, saturazione con Milk 5% in un tampone TBS-TWEEN, per 1 ora a temperatura ambiente;
- Incubazione per tutta la notte con AB 1° (Cell Signaling e Santa Cruz) in BSA o Milk 5% in un tampone TBS-TWEEN, diluizione 1:500-1:1.000 a 4°C;
- 3 lavaggi con TBS-TWEEN 0,1% per 10 minuti a temperatura ambiente;
- Incubazione con AB 2° (anti-rabbit o anti-mouse Jackson Immuno Research) in Milk 5% in un tampone TBS-TWEEN, diluizione 1:10.000 per 1 ora;
- 3 lavaggi con TBS-TWEEN 0,1% per 10 minuti a temperatura ambiente;
- Il blot è stato asciugato su carta 3M e bagnarlo per 1 minuto con ECL,
- Il blot è stato sistemato nella cassetta con la lastra a vari tempi (1-5-30 minuti), e la lastra è stata esposta 1 minuto nel liquido di sviluppo ed 1 minuto nel fissaggio.

- Normalizzazione con tubulina e GAPDH

- Incubazione con AB anti α -Tubulina (Sigma) o con AB anti GAPDH (Gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi) (Santa Cruz) per un'ora a temperatura ambiente in Milk 5% in un tampone TBS-TWEEN 0,1%, diluizione 1:1.000-1:5.000;
- 3 lavaggi con TBS-TWEEN 0,1% per dieci minuti a temperatura ambiente;
- Incubazione con AB 2° (anti-rabbit o anti-mouse Jackson Immuno Research) in Milk 5% in un tampone TBS-TWEEN, diluizione 1:10.000 per 1 ora;
- 3 lavaggi con TBS-TWEEN 0,1% per dieci minuti a temperatura ambiente
- Il blot è stato asciugato su carta 3M e bagnato per 1 minuto con ECL;
- Il blot è stato poi sistemato nella cassetta con la lastra per pochi secondi e la lastra è stata, infine, esposta 1 minuto nel liquido di sviluppo ed 1 minuto nel fissaggio.

L'analisi densitometrica delle bande degli immunoblot è stata realizzata utilizzando il programma Image J (Schneider CA *et al.*, 2012).

6.7 Estrazione dell'RNA totale e retrotrascrizione

Dopo aver allontanato il mezzo sono stati effettuati due lavaggi con PBS 1X. In ogni piastra è stato aggiunto un opportuno volume di TriZOL (Ambion by Life technologies) e si è proceduto alla purificazione dell'RNA totale mediante estrazione con fenolo-cloroformio, come indicato dal protocollo TriZOL. Il pellet di RNA totale è stato solubilizzato in H₂O DEPC (acqua trattata con dietil-pirocarbonato (Sigma) per inibire l'azione dell'RNasi), quantificato mediante lettura spettrofotometrica a 260 nm e controllato su gel all'1,2% di agarosio (Sigma). Nel gel è stato aggiunto Etidio Bromuro (0,5 µg/µL) (Sigma) che permette la visualizzazione del RNA se lo si espone ad una lampada UV.

Gli RNA sono stati trattati con l'enzima DNasi RNasi-free (1 U/µg di RNA totale; DNase I recombinant, Roche Applied Science) per 30 minuti a 37°C e si è poi proceduto all'estrazione dell'RNA aggiungendo H₂O DEPC e fenolo. L'RNA totale è stato nuovamente precipitato con etanolo assoluto a -20 °C over-night ed il pellet è stato poi solubilizzato in H₂O DEPC.

Tutte le reazioni di trascrizione inversa sono state poi eseguite a partire da 3 µg di RNA totale in un volume di reazione di 20 µL contenente 20 U di enzima Superscript II RNase H- Reverse Transcriptase, 4 µL di 5x RT buffer, 1 µL di 0,5 µg/µL di Random primer, 1 µL di 10 mM (ciascuno) dNTP mix, 2 µL di 0.1 M ditiotreitolo (Invitrogen Co.). La miscela di reazione è stata incubata per 50 minuti a 42 °C, cui ha fatto seguito uno stadio di disattivazione di 15 minuti a 70 °C. Infine, sono stati aggiunti 2 µL RNase H (Invitrogen Co.) per la successiva incubazione a 37°C per 20 minuti allo scopo di eliminare gli ibridi di RNA/cDNA.

6.8 Real Time – PCR (Polymerase Chain Reaction)

Gli esperimenti di Real-Time PCR sono stati condotti utilizzando la mix di reazione SYBR Green I Master (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) contenente l'agente intercalante SYBR Green. Il segnale di fluorescenza, dovuto al SYBR Green, è stato monitorato per quantizzare i prodotti di amplificazione specifici in ogni ciclo di PCR mediante Light-Cycler® 480 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

Le reazioni di amplificazione sono state effettuate con il cDNA ottenuto, 4 µL della mix di reazione contenente SYBR Green, 1 µL di ogni specifica coppia di primer (PRIMM, Milan, Italy), ed acqua PCR grade (Roche) per un volume finale di 20 µL.

Di seguito sono elencate le coppie di primer utilizzati: 18S 5'-CGATGCTCTTAGCTGAGTGT-3' e 5'-GGTCCAAGAATTTACCTCT-3'; p21^{Waf1/Cip1} 5'-GAACTTCGACTTTGTCACCG-3' e 5'-GCACAAGGGTACAAGACAGT -3'. Per ogni reazione è stato effettuato un ciclo di preincubazione a 95 °C per 10 minuti, seguito da 40 cicli di denaturazione a 95 °C per 10 secondi, appaiamento a 58 °C per 30 secondi ed estensione a 72 °C per 15 secondi. E' stata valutata la specificità della reazione analizzando la curva di melting ottenuta per ogni amplificato.

I valori di concentrazione sono stati determinati a partire da curve standard ottenute mediante diluizioni seriali di cDNA. I fold-change di induzione sono stati determinati calcolando il rapporto tra i segnali dei campioni derivati da cellule di controllo e quelli dei campioni derivati da cellule trattate, normalizzati per il gene housekeeping scelto, l'RNA ribosomale 18S. Le analisi sono state condotte su almeno 2 replicati tecnici e 3 replicati biologici. La significatività statistica è stata calcolata mediante t_{student} test.

CAPITOLO 7. Risultati

7.1 Effetto del DHA sulla vitalità di linee cellulari mammarie

È ben documentata la capacità del DHA di influenzare negativamente la crescita e la sopravvivenza di numerose linee cellulari (Siddiqui RA *et al.*, 2001; Khan NA *et al.*, 2006; Hu Y *et al.*, 2010). Per confermare tali effetti anche sulle linee cellulari mammarie selezionate per questo studio ed eventualmente evidenziare se l'azione del DHA possa essere, in qualche modo, correlata a qualche specifico fattore biologico, il primo passo è stato quello di analizzare le risposte indotte da diversi trattamenti con questo nutriente sulla crescita cellulare.

A tale scopo, è stato esaminato l'effetto di due diverse concentrazioni di DHA (100 e 300 μ M), sulla vitalità delle quattro linee cellulari di riferimento (MCF-10A, MCF-7, SK-BR-3, ZR-75-1), mediante saggi MTT, bromuro di dimetil-tiazolil-difenil-tetrazolio, substrato delle deidrogenasi mitocondriali. Tutte le linee cellulari sono state incubate con entrambe le dosi di DHA ed il numero di cellule vitali è stato determinato dopo 24, 48 e 72 h e confrontato con quello dei rispettivi controlli non trattati. Infatti, i valori di assorbanza ricavati sono corrispondenti alla quantità di deidrogenasi attive presenti, che risulta essere proporzionale al numero di cellule vive.

Come mostrato in Fig. 13, i trattamenti con DHA hanno indotto solo una lieve riduzione della vitalità delle MCF-7 e delle ZR-75-1 (A e B) rispetto ai valori dei controlli. Nelle MCF-7, minimi (<20%) ma comunque significativi effetti sulla vitalità, sono stati osservati solo con la concentrazione più alta di DHA (A). I piccoli e precoci decrementi del numero di ZR-75-1 vitali dose-dipendenti, tendono invece ad esaurirsi nel tempo (B).

Al contrario, nelle MCF-10A e nelle SK-BR-3 (Fig. 14 A e B), il DHA sembra esercitare una forte azione inibitoria (tempo e dose dipendente) sulla crescita. Nelle MCF-10A arriviamo, dopo 72 h di trattamento con DHA 300 μ M, ad una riduzione quasi del 60% del numero di cellule vitali (A). Il pannello B mostra l'andamento analogo ottenuto anche con le SK-BR-3.

Questi primi dati hanno permesso di individuare una diversa suscettibilità al DHA (in termini di vitalità) da parte di linee cellulari derivate dallo stesso tessuto di origine, e in particolare, tre derivate anche dallo stesso tipo di tumore. È da tenere presente che tali cellule presentano, comunque, un certo numero di caratteristiche biologiche e molecolari distinte.

Risultati

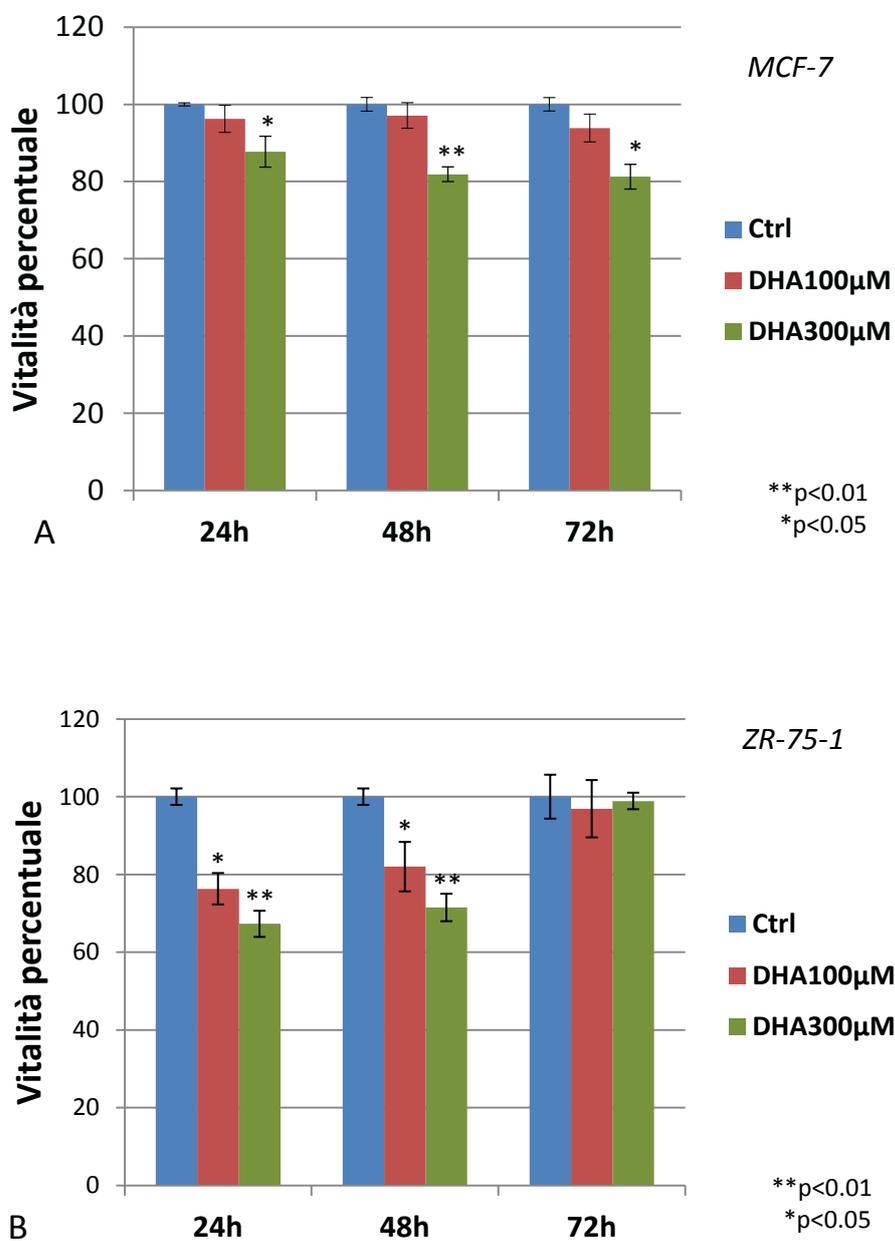


Figura 13. Valutazione della vitalità cellulare mediante test MTT nelle linee MCF-7 (A) e ZR-75-1 (B) dopo 24, 48 e 72 ore di trattamento con DHA 100 e 300 μM. I valori riportati si riferiscono alle medie di almeno tre esperimenti indipendenti ± i valori delle rispettive deviazioni standard.

Risultati

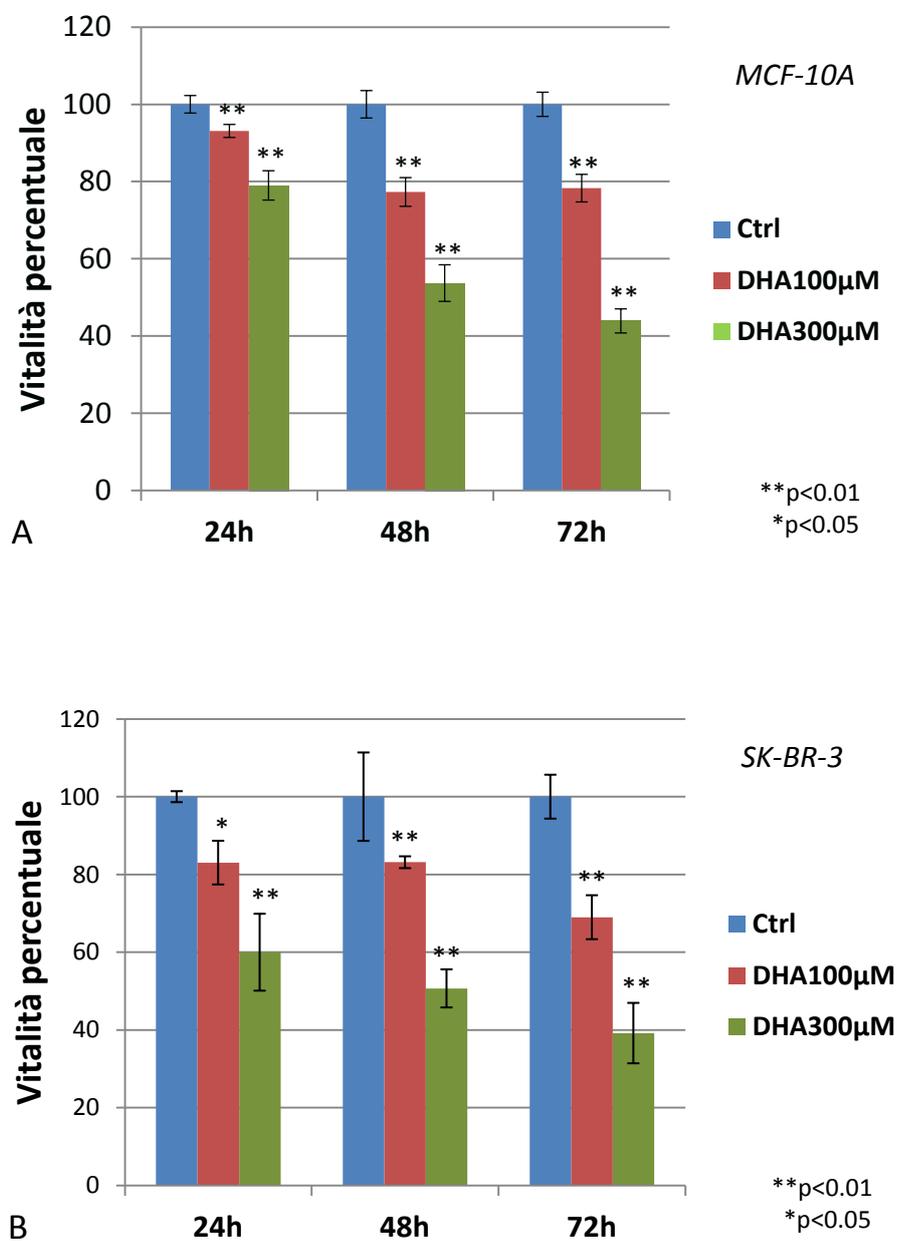


Figura 14. Valutazione della vitalità cellulare mediante test MTT nelle linee MCF-10A (A) e SK-BR-3 (B) dopo 24, 48 e 72 ore di trattamento con DHA 100 e 300 μ M. I valori riportati si riferiscono alle medie di almeno tre esperimenti indipendenti \pm i valori delle rispettive deviazioni standard.

7.2 Effetti del DHA sul ciclo cellulare

Allo scopo di caratterizzare i meccanismi alla base degli effetti antiproliferativi differenziali del DHA nelle diverse linee cellulari mammarie considerate, è stato poi valutato se le riduzioni del numero di cellule, osservate con i saggi MTT, fossero dovute ad un blocco della progressione del ciclo cellulare, oppure ad una induzione di morte cellulare. A questo scopo è stato, dunque, misurato il contenuto di DNA in cellule di controllo ed in cellule trattate per 24, 48 e 72 h con DHA 100 e 300 μM . Tali quantizzazioni sono state realizzate attraverso analisi citofluorimetriche dell'incorporazione nucleare del colorante fluorescente ioduro di propidio (PI). Questo tipo di indagini hanno permesso di valutare sia le eventuali alterazioni della distribuzione delle cellule nelle diverse fasi del ciclo cellulare sia la frammentazione del DNA, ovvero la percentuale di cellule ipodiploidi (in fase subG0/G1), caratteristica del fenomeno apoptotico/necrotico.

Visto che dalle analisi della vitalità cellulare precedentemente condotte, sono emerse due tipologie di risposte al trattamento con DHA, ovvero un forte o debole/assente effetto antiproliferativo, per le indagini successive, è stata considerata la possibilità di selezionare soltanto due delle linee cellulari mammarie precedentemente esaminate: una sensibile e l'altra insensibile (o molto poco) alla somministrazione dell'acido grasso. Tuttavia, mentre le due linee cellulari che si sono dimostrate poco sensibili al trattamento con DHA, le MCF-7 e le ZR-75-1, risultano piuttosto paragonabili, sia in termini biochimici (entrambe estrogeno positive, ER+), sia in termini fenotipici e di grado di aggressività (sono entrambe cellule tumorali poco invasive), le due linee che hanno particolarmente risentito dell'effetto antiproliferativo mediato dal DHA, MCF-10A e SK-BR-3, presentano caratteristiche molto diverse. Le prime, in particolare, sono cellule mammarie considerate "normali" in quanto immortalizzate ma non tumorali, mentre le seconde sono cellule derivate da carcinoma mammario dotate anche di un certo grado di invasività. Entrambe risultano estrogeno negative (ER-). Considerando dunque le loro diversità biochimiche e fenotipiche, si è ritenuto opportuno impiegare sia le MCF-10A sia le SK-BR-3 per le indagini successive, mentre solo le MCF-7 sono state selezionate come linea di riferimento poco sensibile al DHA.

I pannelli A e B della Fig. 15 mostrano come il DHA è in grado di provocare un consistente aumento di MCF-10A nella fase G0/G1 dose dipendente (di circa il 14% ed il 25% rispettivamente con DHA 100 e 300 μM) ed uno più piccolo in fase G2/M (solo con la dose più alta di DHA), già dopo 24 h di trattamento. Tali incrementi delle percentuali di cellule, soprattutto nella fase G0/G1 del ciclo cellulare, risultano accoppiati ad una riduzione, piuttosto equivalente, del numero di cellule in fase S, e a nessuna variazione della percentuale di cellule ipodiploidi (indice di mortalità cellulare). Dopo 48 e 72 h (Fig. 16A-B e 17A-B, rispettivamente), nelle stesse cellule, si riduce il blocco in fase G0/G1 provocato dal DHA 300 μM , mentre si osserva un significativo aumento della percentuale di cellule in fase subG0/G1 (del 25% e del 30% rispettivamente dopo 48 e 72 h) ed in fase G2/M. La dose più bassa di DHA, invece, soprattutto dopo 72 h, mantiene il blocco in G0/G1 accompagnato, però, da un incremento tempo dipendente del numero di cellule ipodiploidi.

Nelle MCF-7 il trattamento di 24 h con DHA non sembra provocare alcuna variazione significativa sia della proporzione di cellule apoptotiche/necrotiche sia della normale progressione del ciclo cellulare, a parte un piccolo blocco in fase S (<5%) con la concentrazione più bassa di DHA (Fig. 15C-D). Questo andamento si mantiene piuttosto simile anche dopo 48 e 72 h (Fig. 16C-D e 17C-D, rispettivamente). A questi

Risultati

tempi di trattamento, tuttavia, è possibile osservare una inattesa riduzione della percentuale di cellule ipodiploidi rispetto al controllo.

Le analisi citofluorimetriche, condotte sulle SK-BR-3, mostrano come il trattamento di queste cellule con entrambe le dosi di DHA provochi un rapido (già dopo 24 h) e significativo aumento del picco ipodiploide e nessuna rilevante alterazione della progressione del ciclo cellulare (Fig. 15E-F). Con i tempi più lunghi di trattamento (48 e 72 h), il picco ipodiploide si mantiene piuttosto costante, mentre iniziano ad evidenziarsi aumenti un po' più significativi delle percentuali di cellule in fase S (solo con DHA 100 μ M) e in fase G2/M (solo con DHA 300 μ M) (Fig. 16E-F e 17E-F).

Da queste indagini e dalla loro analisi, è stato possibile individuare diverse modalità di risposta al trattamento con diverse concentrazioni di DHA, in tre distinte linee cellulari derivate dallo stesso tipo di tessuto. Certamente questi dati confermano la maggior suscettibilità al DHA da parte delle MCF-10A e delle SK-BR-3 rispetto alle MCF-7. Tuttavia, anche tra le due linee più suscettibili esistono delle differenze, maggiormente evidenti ai tempi più bassi di trattamento (24 h). Tali differenze riguardano, in particolare, i meccanismi attraverso i quali il DHA determina la riduzione del numero di cellule vitali; ovvero (Fig. 15) (a) attraverso l'induzione di un forte blocco del ciclo cellulare in fase G0/G1 (nelle MCF-10A); (b) attraverso una precoce induzione di mortalità cellulare (nelle SK-BR-3).

Risultati

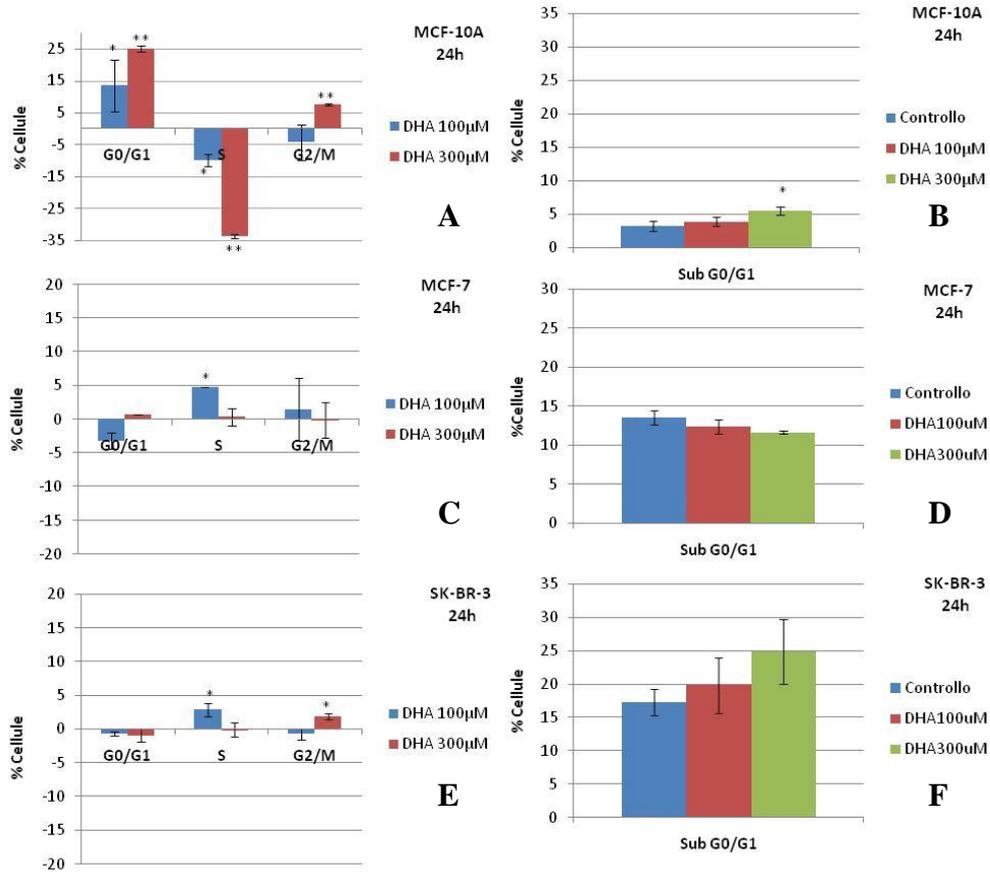


Figura15. Analisi del ciclo cellulare e della frammentazione del DNA mediante citofluorimetria nelle cellule MCF-10A (A, B), MCF-7 (C, D) e SK-BR-3 (E, F) dopo 24 h di trattamento con DHA 100 e 300 µM. I grafici A, C e E riportano gli aumenti o le riduzioni rispetto al controllo delle percentuali di cellule trattate nelle fasi G0/G1, S e G2/M del ciclo cellulare. I grafici B, D e F mostrano le percentuali di cellule di controllo o trattate in fase subG0/G1. I valori riportati rappresentano le medie di tre esperimenti indipendenti \pm le rispettive deviazioni standard. * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$.

Risultati

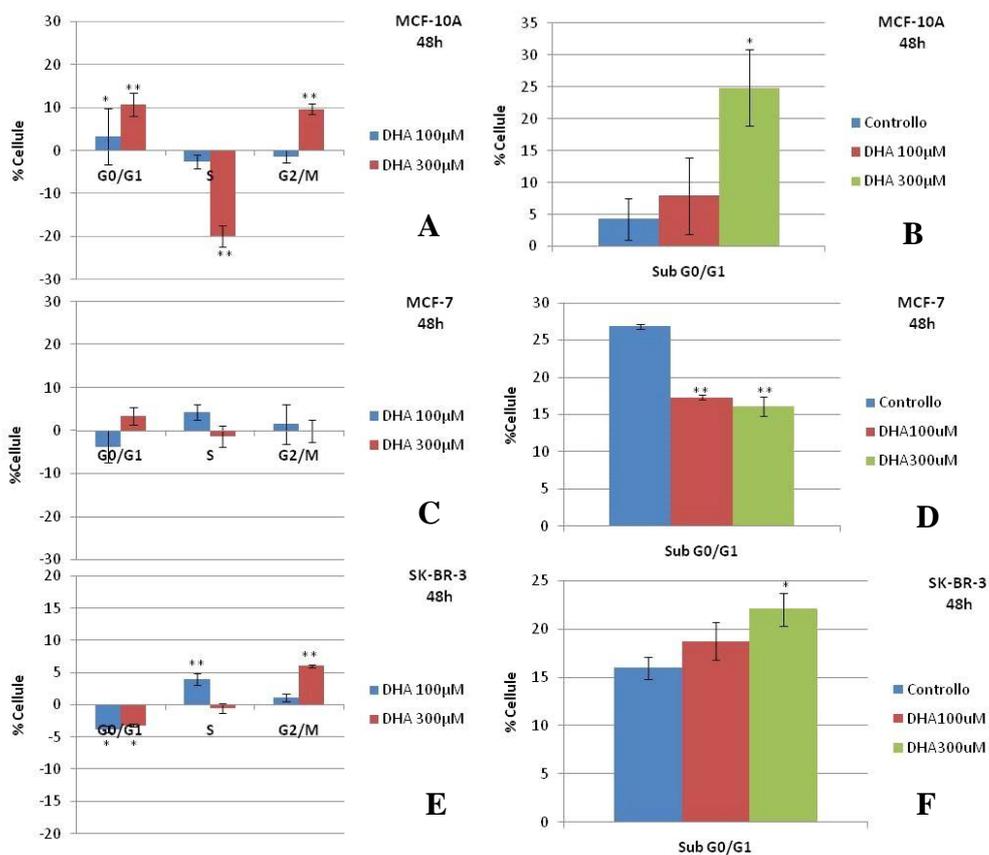


Figura 16. Analisi del ciclo cellulare e della frammentazione del DNA mediante citofluorimetria nelle cellule MCF-10A (A, B), MCF-7 (C, D) e SK-BR-3 (E, F) dopo 48 h di trattamento con DHA 100 e 300 μ M. I grafici A, C e E riportano gli aumenti o le riduzioni rispetto al controllo delle percentuali di cellule trattate nelle fasi G0/G1, S e G2/M del ciclo cellulare. I grafici B, D e F mostrano le percentuali di cellule di controllo o trattate in fase subG0/G1. I valori riportati rappresentano le medie di tre esperimenti indipendenti \pm le rispettive deviazioni standard. * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$.

Risultati

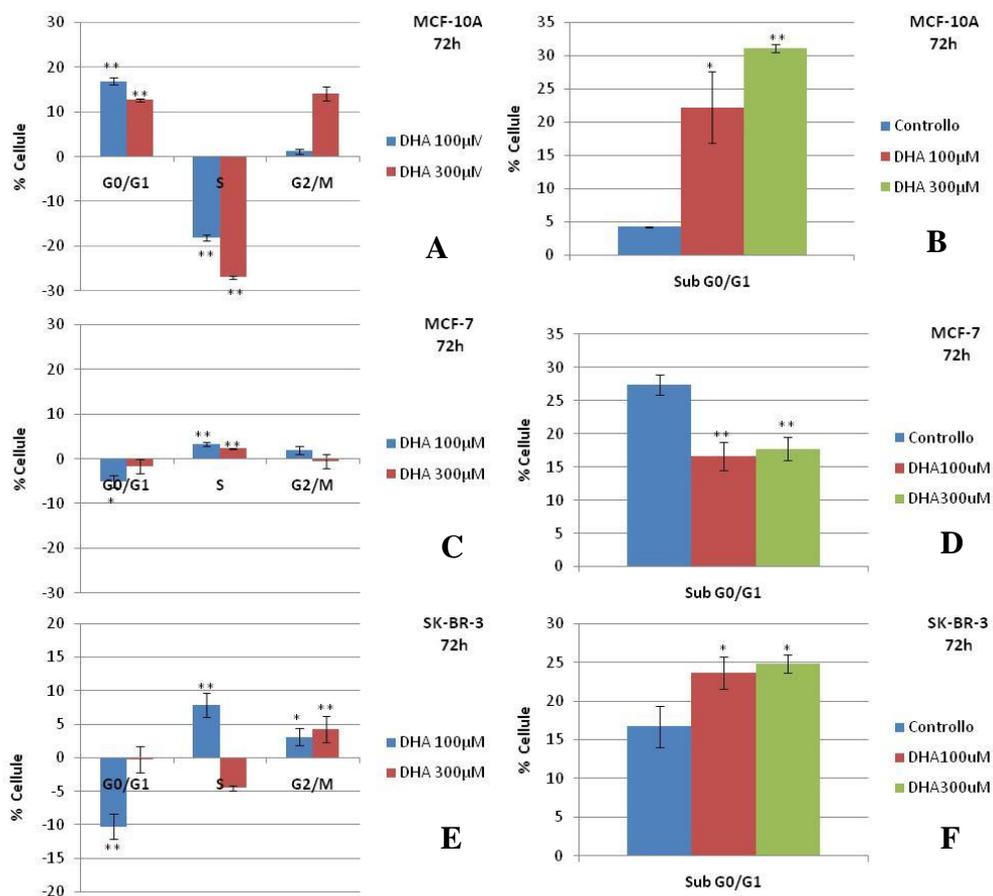


Figura 17. Analisi del ciclo cellulare e della frammentazione del DNA mediante citofluorimetria nelle cellule MCF-10A (A, B), MCF-7 (C, D) e SK-BR-3 (E, F) dopo 72 h di trattamento con DHA 100 e 300 µM. I grafici A, C e E riportano gli aumenti o le riduzioni rispetto al controllo delle percentuali di cellule trattate nelle fasi G0/G1, S e G2/M del ciclo cellulare. I grafici B, D e F mostrano le percentuali di cellule di controllo o trattate in fase subG0/G1. I valori riportati rappresentano le medie di tre esperimenti indipendenti \pm le rispettive deviazioni standard. * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$.

7.3 Effetto del DHA sull'attivazione dei pathway di ERK1/2 e STAT3

Al fine di studiare i meccanismi molecolari alla base dell'azione differenziale del DHA sulla crescita delle diverse linee cellulari considerate, il passo successivo è stato quello di valutare la capacità di tale nutriente di influenzare l'attivazione di alcuni pathway comunemente coinvolti nella regolazione della proliferazione e della progressione del ciclo cellulare. A tal fine sono stati esaminati i livelli di attivazione delle chinasi ERK 1/2 e del fattore di trascrizione STAT3 in seguito all' incubazione di ogni linea cellulare con DHA 300 μ M per 2, 16 e 24 h.

Siccome queste proteine vengono attivate in seguito alla fosforilazione di specifici residui amminoacidici, per valutarne lo stato di attivazione sono stati misurati i livelli di espressione delle rispettive forme fosforilate mediante analisi di Western Blot. L'attivazione di ERK 1 e 2 richiede la fosforilazione dei residui di treonina 202/ tirosina 204 (Thr202/Tyr204) e dei residui di treonina 185/ tirosina 187 (Thr185/Tyr187), rispettivamente. STAT3 viene attivato mediante la fosforilazione del residuo di tirosina 705 (Tyr705), che ne induce la dimerizzazione, la traslocazione nucleare e il legame al DNA (Darnell Jr JE *et al.*, 1994; Ihle JN and Kerr IM, 1995). L'attivazione trascrizionale di questo fattore risulta essere regolata, invece, dalla fosforilazione della serina 727 (Ser727) mediante il pathway MAPK o il pathway di mTOR (Wen Z *et al.*,1995; Yokogami K *et al.*, 2000).

Per questi esperimenti, e anche per i successivi, abbiamo deciso di utilizzare soltanto la dose più alta di DHA (300 μ M), ovvero quella che sembra aver indotto gli effetti più evidenti a tutti i tempi di incubazione considerati.

Dalle analisi di Western Blotting condotte risulta evidente come il DHA sia in grado di indurre un significativo incremento dei livelli di fosforilazione di ERK 1/2 rispetto al controllo nelle MCF-10A, già dopo 2 e fino a 24 h di trattamento (Fig. 18, prima colonna). Tali livelli di fosforilazione sono solo debolmente influenzati dal DHA nelle MCF-7 (Fig. 18, seconda colonna). In tale linea, in particolare, si inizia ad osservare una certa riduzione rispetto al controllo dell'espressione delle forme fosforilate di ERK, solo dopo 24 h di trattamento con DHA (Fig. 18, seconda colonna). Tale nutriente provoca, infine, una significativa inibizione dell'attivazione di questi fattori nelle SK-BR-3 dopo tutti e tre i tempi di trattamento (Fig. 18, terza colonna). L'espressione della forma totale di ERK (fosforilata e non) non risulta invece influenzata dai trattamenti in tutte le linee cellulari esaminate (Fig. 18). Questo certamente suggerisce che gli aumenti e le riduzioni dei livelli di fosforilazione di ERK osservati, non sono imputabili ad un incremento dell'espressione della proteina. Sono state utilizzate l' α -tubulina o la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) come riferimento di normalizzazione.

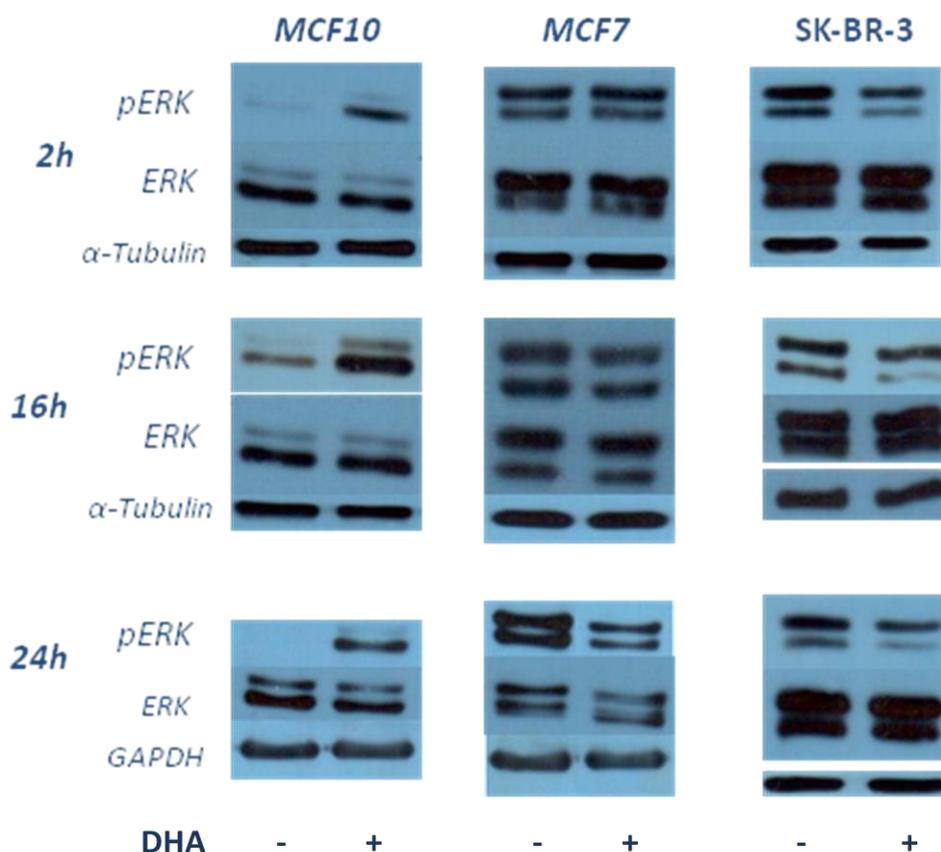


Figura 18. Analisi dei livelli di espressione di pERK 1/2 mediante Western Blotting dei lisati totali di MCF-10A, MCF-7 e SK-BR-3 trattate o meno con DHA 300 μ M per 2, 16 e 24 h. I blot mostrati sono rappresentativi di almeno tre esperimenti indipendenti.

La Fig. 19 mostra invece i risultati delle analisi di Western Blot dei livelli di fosforilazione di STAT3 sulla serina 727, che costituiscono, come accennato, una misura della sua attività di modulazione dell'espressione genica. Anche in questo caso, i livelli delle forme fosforilate di questa proteina risultano significativamente e rapidamente (già dopo 2 h) incrementati dal trattamento con DHA nelle MCF-10A fino a 24 h. Nessuna variazione significativa della fosforilazione di STAT3 è stata, invece, evidenziata nelle MCF-7 ai tempi più brevi di trattamento. Una certa riduzione rispetto al controllo inizia invece ad essere osservata solo dopo 24 h (circa del 50%). Infine, nelle SK-BR-3 il DHA ha mostrato di inibire l'attivazione di STAT3 in maniera più significativa solo con i trattamenti di 16 e di 24 h (riduzione del 30% e 60% circa, rispettivamente).

Di nuovo, il DHA non sembra influenzare in nessun caso i livelli di espressione della forma totale di STAT3 (fosforilata e non). Dunque, gli incrementi e le riduzioni osservate sono tutte da correlare con stimolazioni o inibizioni della fosforilazione della proteina e non con variazioni dei suoi livelli di espressione. Anche in questo caso i blot sono stati normalizzati con α -tubulina oppure con GAPDH.

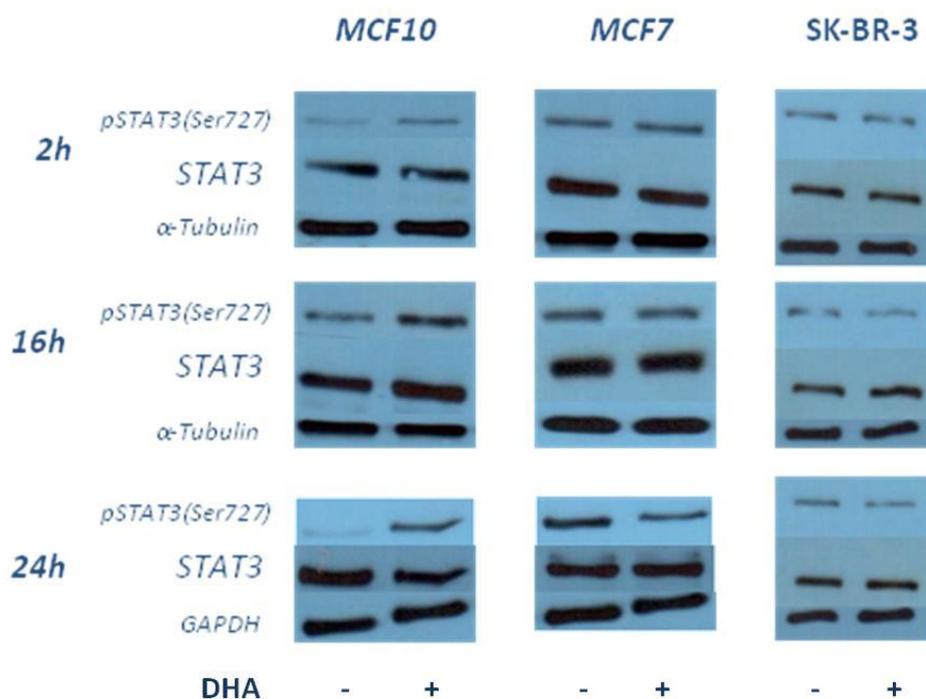


Figura 19. Analisi dei livelli di espressione di pSTAT3 (Ser727) mediante Western Blotting dei lisati totali di MCF-10A, MCF-7 e SK-BR-3 trattate o meno con DHA 300 μ M per 2, 16 e 24 h. I blot mostrati sono rappresentativi di almeno tre esperimenti indipendenti.

Dall'analisi di questi dati è possibile, dunque, dedurre che in linee cellulari dello stesso tipo ma con caratteristiche differenti, il DHA è in grado di influenzare in maniera differenziale lo stato di attivazione di due proteine enzimatiche chiave nella regolazione della sopravvivenza e della crescita cellulare, e di conseguenza, si suppone, anche le vie di segnale intracellulari ad esse associate. Riassumendo i risultati ottenuti, infatti, è possibile certamente affermare che i trattamenti con DHA condotti hanno determinato:

- la stimolazione (rapida) dell'attivazione di ERK1/2 e di STAT3 solo nelle MCF-10A;
- la riduzione degli stessi tipi di attivazione nelle SK-BR-3;
- nessuna influenza dello stato di attivazione delle due proteine (o solo debolmente e tardivamente) nelle MCF-7.

Considerando solo le bande relative ai controlli, da questo tipo di analisi è stato anche possibile evidenziare come le tre linee cellulari presentino livelli basali di attivazione di ERK1/2 e di STAT3 molto diversi. In particolare, le MCF-10A presentano livelli di fosforilazione di tali proteine molto più bassi (quasi prossimi allo zero) rispetto a quelli delle MCF-7 e delle SK-BR-3. Tali differenze rifletterebbero le diverse caratteristiche fenotipiche presenti tra queste linee cellulari. Infatti, le MCF-7 e le SK-BR-3 sono cellule tumorali in cui le numerose mutazioni geniche che hanno

portato alla trasformazione cellulare possono certamente aver contribuito alla determinazione di una iper-attivazione di numerosi pathway stimolatori della crescita.

7.4 Effetto del DHA sull'espressione di p21^{Waf1/Cip1}

Vista la capacità del DHA di influenzare in modo differenziale il ciclo di cellule derivate dallo stesso tessuto di origine e di modulare in maniera cellula-specifica l'attivazione di pathway comunemente coinvolti nel controllo della proliferazione e trasformazione cellulare, al fine di chiarirne ulteriormente i meccanismi d'azione nelle diverse linee mammarie prese in esame, in un secondo momento è stato verificato l'effetto di tale nutriente sull'espressione di molecole direttamente coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare, tra cui p21^{Waf1/Cip1}. È stato scelto questo fattore in quanto regolatore centrale della progressione del ciclo cellulare dalla fase G1 alla fase S. Proprio a livello di questo checkpoint del ciclo cellulare il DHA è stato in grado di indurre un forte e precoce arresto delle MCF-10A, non evidenziato nelle altre due linee cellulari esaminate. Inoltre, p21 costituisce uno dei principali target genici del fattore di trascrizione STAT3 di cui sono stati adeguatamente misurati i livelli di attivazione in risposta al DHA, che, in maniera inattesa, sono risultati aumentati proprio nella linea non tumorale MCF-10A.

Sono stati analizzati i livelli proteici di p21 in tutte e tre le linee cellulari di riferimento trattate o meno con DHA 300 µM per 2, 8 e 24 h. La prima colonna della Fig. 20 mostra come i livelli proteici di p21 siano incrementati dalla somministrazione di DHA nelle MCF-10A già dopo 2 h di trattamento e in maniera più consistente dopo 8 e 24 h. Nessuno dei trattamenti determina variazioni significative dell'espressione di p21 nelle MCF-7 (Fig. 20, seconda colonna). Anche le SK-BR-3 hanno mostrato un andamento analogo (Fig. 20, terza colonna). La proteina GAPDH è stata utilizzata come riferimento di normalizzazione.

Risultati

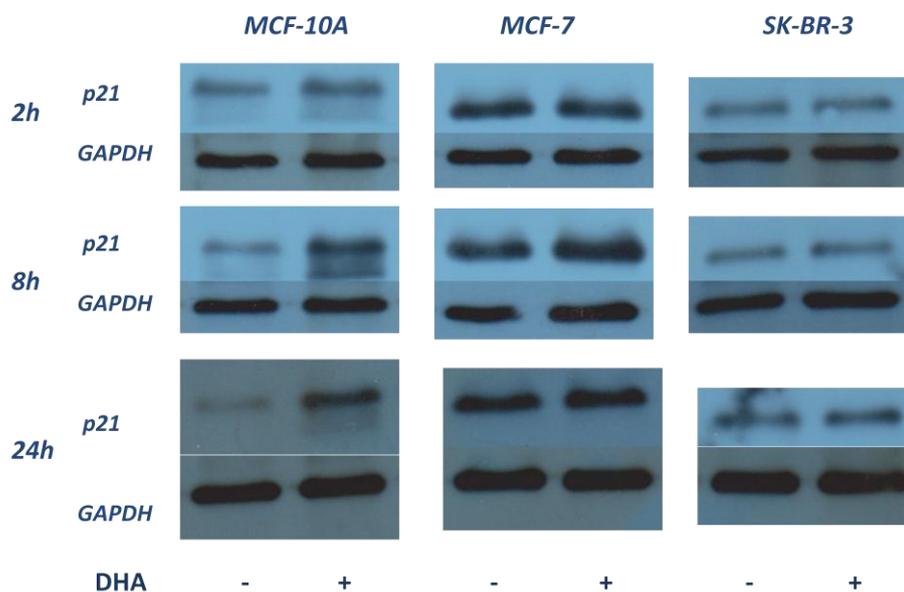


Figura 20. Analisi dei livelli di espressione di p21 mediante Western Blotting dei lisati totali di MCF-10A, MCF-7 e SK-BR-3 trattate o meno con DHA 300 μ M per 2, 8 e 24 h. I blot mostrati sono rappresentativi di almeno tre esperimenti indipendenti.

L'analisi dei soli controlli permette, inoltre, di evidenziare che le MCF-7 costituiscono la linea cellulare con l'espressione basale più alta dell'inibitore p21, mentre le MCF-10A presentano i livelli più bassi di questa proteina.

Considerando questi dati, c'è da dire che ancora una volta il DHA ha dimostrato di indurre risposte cellulari differenziali, ed in particolare di:

- incrementare i livelli dell'inibitore del ciclo p21^{Waf1/Cip1} nelle MCF-10A;
- non indurre alcun effetto sui livelli proteici dello stesso fattore nelle altre due linee cellulari tumorali considerate (MCF-7 e SK-BR-3).

Tali risultati sembrano in accordo con l'ipotesi secondo la quale il rapido blocco in fase G0/G1 promosso dal DHA solo nelle MCF-10A possa essere imputato ad una altrettanto rapida induzione dell'attività inibitoria di p21, attraverso un aumento dell'espressione della sua proteina. Nelle linee cellulari in cui tale arresto precoce del ciclo non è stato evidenziato (MCF-7 e SK-BR-3), i livelli della stessa proteina sono risultati inalterati dal trattamento con DHA. Visto che, nelle medesime condizioni sperimentali, nelle MCF-10 è stato anche osservato un rapido incremento (già dopo 2 h di incubazione con DHA) dell'attivazione di STAT3, uno dei principali regolatori del promotore di p21, resta da capire se l'aumento dei livelli proteici di p21 possa essere correlato con un aumento della trascrizione STAT3-mediata del suo gene.

A tale scopo, successivamente, è stata esaminata l'espressione di p21 anche a livello di RNA messaggero (mRNA) mediante analisi di Real Time-PCR. Per tali indagini ci si è focalizzati soltanto sulle due linee cellulari che hanno mostrato una risposta praticamente opposta alla somministrazione del DHA, ovvero quella più sensibile (MCF-10A) e quella meno sensibile (MCF-7). Inoltre è stato selezionato il

Risultati

tempo di trattamento (8 ore) che ha indotto il maggior incremento dell'espressione della proteina p21 (il 200% circa di incremento) nelle MCF-10A (Fig. 20, prima colonna). Ricordiamo che, nelle stesse condizioni sperimentali (8 ore di incubazione con DHA 300 μ M), le MCF-7 non hanno subito alcuna variazione dell'espressione della stessa proteina (Fig. 20, seconda colonna).

Il grafico riportato in Fig. 21 A mostra come nelle MCF-10A il DHA esplichi la sua azione di up-regolazione di p21 anche a livello trascrizionale, infatti è stato ottenuto un incremento del messaggero del 50% circa. Più sorprendente è l'effetto che si osserva nelle MCF-7; infatti, pur non mostrando nessuna regolazione di p21 a livello proteico, analizzando il messaggero riscontriamo una sensibile riduzione con DHA 300 μ M a 8 ore (Fig. 21 B). La normalizzazione dei livelli di mRNA è stata condotta utilizzando l'RNA housekeeping 18S.

Probabilmente le condizioni sperimentali usate per l'analisi dei livelli proteici di p21 nelle MCF-7 non sono sufficienti per osservarne la regolazione, visibile invece a livello del messaggero. E' noto infatti che i processi che intercorrono tra la sintesi dell'mRNA e la sintesi della proteina in quanto tale, richiedono tempi variabili e comunque mai nulli; pertanto effetti registrati a livello trascrizionale possono non essere immediatamente visibili a livello proteico.

Risultati

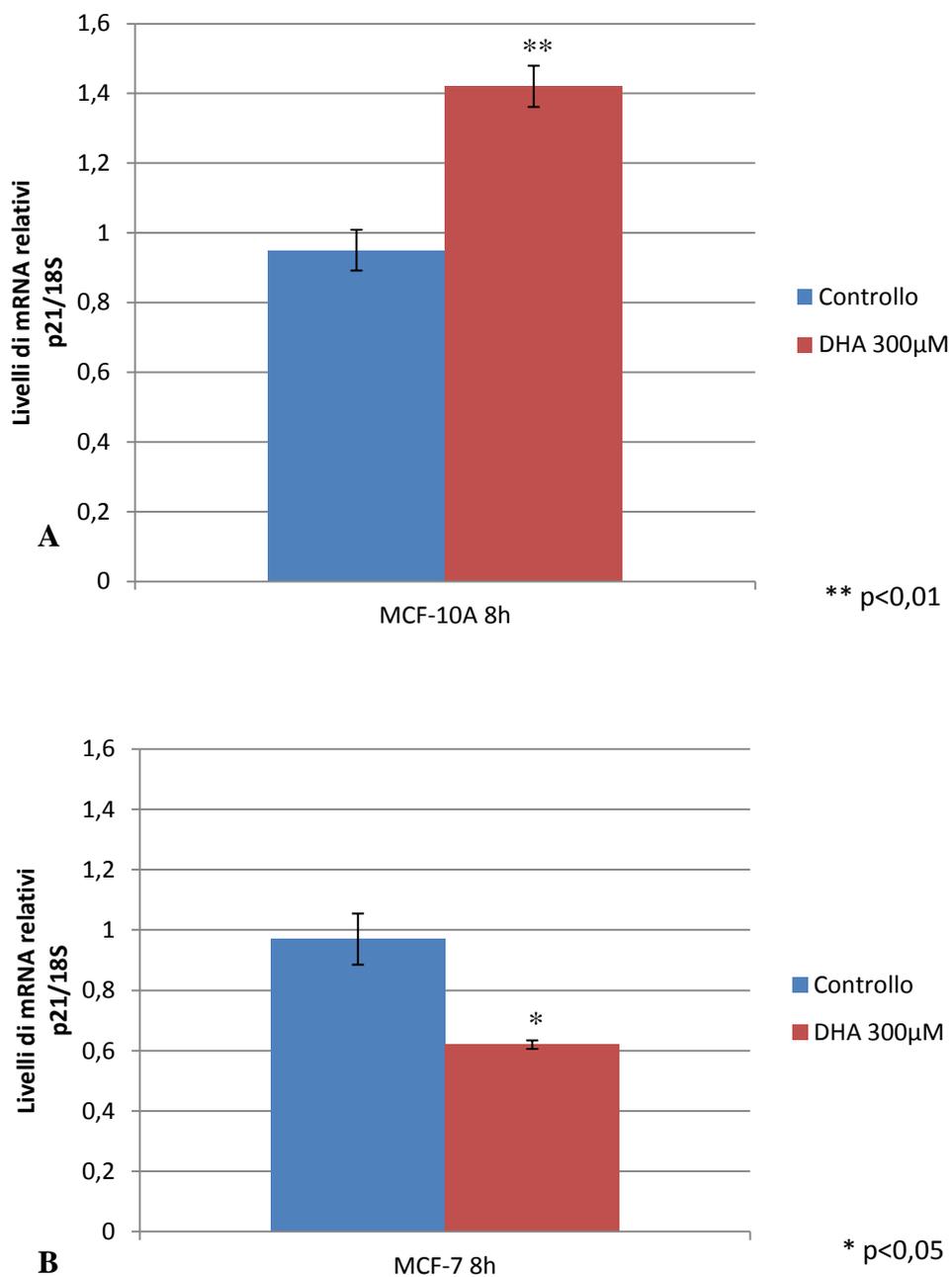


Figura 21. Livelli di espressione dell'mRNA di p21 ^{Waf1/Cip1} nelle MCF-10A (A) e nelle MCF-7 (B) dopo 8 h di incubazione con DHA 300µM. Dopo il trattamento l'mRNA totale è stato estratto e analizzato mediante Real Time-PCR. I dati mostrati si riferiscono alle medie di tre esperimenti indipendenti ± le rispettive deviazioni standard.

Queste analisi di Real Time-PCR hanno permesso non solo di confermare la capacità del DHA di stimolare l'espressione di p21 solo nelle MCF-10A, ma di evidenziare, anche questa volta, risposte differenziali (in questo caso opposte) al trattamento con questo nutriente, in due diverse linee cellulari. Inoltre, gli stessi risultati potrebbero effettivamente lasciare ipotizzare che l'aumento dell'espressione dell'mRNA di p21 nelle MCF-10A possa essere provocato dalla rapida stimolazione, precedentemente evidenziata, dell'attività trascrizionale del fattore STAT3 mediata dal DHA.

Tuttavia, l'aumento di espressione della proteina p21 è già evidente dopo 2 h di trattamento con DHA, lasciando intuire che anche altri meccanismi di regolazione, post-trascrizionali e post-traduzionali potrebbero essere responsabili di tali modulazioni.

7.5 Effetto del DHA sull'espressione di p53

Oltre ai trasduttori del segnale e attivatori di trascrizione STAT, altri fattori chiave nella regolazione dell'espressione di p21 includono Sp1/Sp3, Smads, Ap2, p53, BRCA1, E2F-1/E2F-3. Tra tutti questi fattori, la proteina p53 risulta particolarmente interessante per il suo ruolo centrale nella regolazione dei meccanismi di sopravvivenza e di crescita cellulare.

Per verificare se l'incremento di espressione di p21 evidenziato nelle MCF-10A in seguito al trattamento con DHA possa essere anche p53-dipendente ed eventualmente evidenziare un ruolo anche di questa proteina negli effetti cellula-specifici osservati, è stata anche valutata la capacità del nutriente di influenzare l'espressione di questo fattore trascrizionale.

A tale scopo sono state condotte analisi di Western Blot dei livelli di p53, nei lisati totali ottenuti da tutte e tre le linee cellulari (MCF-10 A, MCF-7, SK-BR-3) incubate o meno con DHA 300 μ M per 2, 8 e 24 h. In Fig. 22 sono riportati gli esiti dei relativi immunoblotting.

Nelle MCF-10A (prima colonna) si osserva una rapida (a 2 ore) e forte stimolazione DHA-mediata di p53 che tende, tuttavia ad indebolirsi nel tempo (incremento del 95% e del 60% circa dopo 8 e 24 h, rispettivamente). Sorprendentemente, è stato evidenziato un aumento dei livelli di p53, nelle stesse condizioni sperimentali, anche nelle MCF-7, seppure di entità piuttosto debole (seconda colonna). Come atteso, invece, nelle SK-BR-3, analogamente a quanto evidenziato per p21, nessun trattamento con DHA ha determinato variazioni significative del fattore esaminato (terza colonna). Anche in questo caso i blot sono stati tutti normalizzati considerando i segnale relativi alla proteina GAPDH.

Risultati

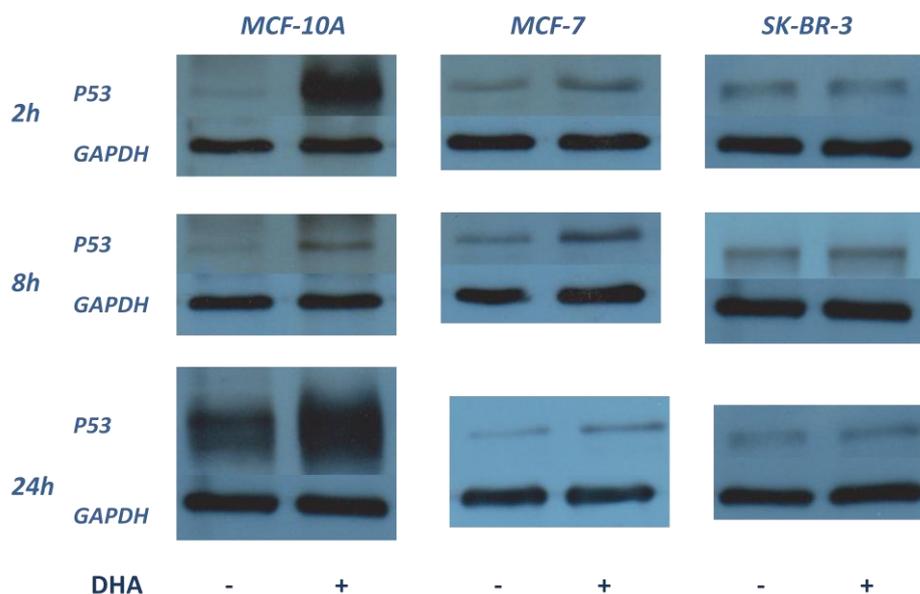


Figura 22. Analisi dei livelli di espressione di p53 mediante Western Blotting dei lisati totali di MCF-10A, MCF-7 e SK-BR-3 trattate o meno con DHA 300 μ M per 2, 8 e 24 h. I blot mostrati sono rappresentativi di almeno tre esperimenti indipendenti.

Considerando questi dati alla luce di quelli precedentemente ottenuti, può essere possibile supporre che nelle MCF-10A, anche la forte induzione iniziale dell'espressione di p53 promossa dal DHA possa essere responsabile della stimolazione dell'espressione di p21. Il fatto che l'up-regolazione di p53 provocata dal DHA tenda ad indebolirsi nel tempo, potrebbe suggerire che in un secondo momento, il mantenimento dello stato di attivazione di STAT3 o di altri fattori non esaminati, possano sostenere l'overespressione di p21.

A parte la riduzione dell'mRNA di p21 evidenziata attraverso le analisi di Real Time-PCR, l'aumento dell'espressione di p53 sembra costituire la sola risposta indotta dal DHA nelle MCF-7 a livello molecolare. Tuttavia, in questo caso, agli incrementi osservati non corrispondono né gli aumenti attesi della regolazione di p21, specialmente a livello del messaggero, né gli effetti antiproliferativi comunemente associati all'attività di questo fattore.

Infine, i dati relativi alle SK-BR-3, in cui, come per p21, non sono state riscontrate variazioni dell'espressione di p53, confermerebbero l'ipotesi secondo la quale, in questa linea cellulare, l'effetto antiproliferativo del DHA, sia essenzialmente determinato attraverso l'inibizione di pathway (come quelli di ERK e di STAT3) che normalmente stimolano la sopravvivenza e la crescita cellulare.

CAPITOLO 8. Discussione e conclusioni

E' ormai oggi assodata l'esistenza di una relazione stringente tra alimentazione e insorgenza e/o prevenzione di patologie, incluse quelle di rilevante interesse sociale per la loro diffusione, quali disordini cardiovascolari e tumori (Verschuren WM, 2012; Willett WC, 2000; Greenwald P *et al.*, 2001; Wicki A and Hagmann J, 2011; Baena Ruiz R and Salinas Hernández P, 2014). Negli ultimi anni si sono dunque moltiplicati gli studi scientifici focalizzati sulla ricerca del potenziale ruolo dei singoli nutrienti nei meccanismi eziologici di queste malattie.

Particolarmente al centro di questo tipo di indagini vi sono sicuramente gli acidi grassi polinsaturi della serie Omega 3 (n-3 PUFA), visti e dimostrati i loro effetti benefici nella prevenzione delle patologie cardiovascolari (Bang HO *et al.*, 1971; Leaf A, 2001). Essi costituiscono un gruppo di acidi grassi, presenti in elevate quantità nei prodotti ittici, il cui precursore è rappresentato dall'acido α -linolenico (ALA). L'acido eicosapentanoico (EPA) e l'acido docosaesaenoico (DHA) si manifestano come i composti più attivi della serie n-3 in quanto dotati di una serie di importanti funzioni energetiche, metaboliche e strutturali all'interno del nostro organismo, con maggiore riferimento al secondo composto che nelle varie analisi è risultato sempre più attivo rispetto al primo.

I meccanismi mediante i quali gli n-3 PUFA esercitano effetti protettivi a livello cardiovascolare sono sia funzionali che metabolici: essi determinano una maggiore fluidità di membrana, migliorano la funzione endoteliale (valutata sia direttamente sia mediante il dosaggio di molecole di adesione delle quali essi riducono l'espressione genica), modulano l'aggregazione piastrinica, intervengono sul metabolismo degli eicosanoidi, stabilizzano le lesioni ateromasiche, e sono dotati di una significativa azione di tipo antiaritmico (Calder PC, 2004).

Diverse attività molecolari e cellulari promosse da tali nutrienti suggerirebbero una loro potenziale capacità di influenzare anche diversi stadi dei processi di carcinogenesi e di progressione tumorale, tra cui (a) l'inibizione dell'attività delle cicloossigenasi (COX) (Rose DP, 1997), (b) la modificazione della stato delle membrane cellulari (Escrich E *et al.*, 2007), anche attraverso alterazioni dell'attività di recettori e molecole di trasduzione del segnale, (c) aumento dello stress ossidativo cellulare (Larsson SC *et al.*, 2004), (d) regolazione dell'attività di fattori di trascrizione e dell'espressione genica (Larsson SC *et al.*, 2004). Tutte queste potenzialità degli Omega 3 hanno certamente incoraggiato negli anni lo studio del ruolo svolto da tali acidi grassi nell'eziologia delle patologie neoplastiche sia attraverso l'impiego di modelli *in vivo* che *in vitro* (Rose DP and Connolly JM, 1999; Cockbain AJ *et al.*, 2012). Tuttavia, la nostra conoscenza degli aspetti molecolari dell'attività antitumorale degli n-3 PUFA, resta ancora piuttosto preliminare, lasciando ancora piuttosto aperto il dibattito sull'effettivo ruolo benefico degli Omega 3 nella prevenzione delle patologie cancerose.

Difatti, molti studi epidemiologici anche recenti (Gerber M, 2012; Shen XJ *et al.*, 2012; Ibiebele TI *et al.*, 2012; Wallingford SC *et al.*, 2013; Noel SE *et al.*, 2014; Song M *et al.*, 2014; Crowe FL *et al.*, 2014) riporterebbero evidenze insufficienti o comunque poco chiare della potenziale associazione tra il consumo di Omega 3 e il rischio di diversi tipi di tumori. Queste ricerche sembrano in contrasto con le numerose evidenze di laboratorio della capacità degli n-3 di regolare negativamente i processi di differenziamento e sviluppo tumorale (Liu G *et al.*, 2001; Berquin IM *et al.*, 2007; Wang S *et al.*, 2012; Laviano A *et al.*, 2013; Merendino N *et al.*, 2013). Con l'eccezione di pochi studi (Dahm CC *et al.*, 2012; Brasky TM *et al.*, 2013), nel loro insieme, tutte queste ricerche suggeriscono un ruolo benefico degli Omega 3 sullo

Discussione e conclusioni

sviluppo delle patologie neoplastiche che potrebbe dipendere dal tipo di tumore considerato e dalle sue caratteristiche biochimiche, molecolari e fenotipiche.

Partendo da queste considerazioni, è stato condotto uno studio di approfondimento dei meccanismi alla base degli effetti anti-tumorali degli n-3 PUFA, utilizzando un nuovo approccio basato sull'analisi delle risposte indotte da questi composti (in particolare dal DHA) non in uno solo, ma a livello di più modelli cellulari. Con questo tipo di linea sperimentale poteva essere possibile non solo chiarire l'effettivo ruolo di questi nutrienti nell'eziologia ed evoluzione delle patologie neoplastiche ma anche di individuare i loro specifici meccanismi d'azione oppure gli eventuali fattori biologici che sono in grado di influenzare.

È stato preso in esame, in particolare, il carcinoma mammario in quanto costituisce la più diffusa patologia neoplastica tra le donne nel mondo, con una stima di circa un milione di nuovi casi l'anno. Inoltre, diverse indagini epidemiologiche e sperimentali avrebbero suggerito che gli acidi grassi della dieta, soprattutto gli n-3 EPA e DHA, sono in grado di influenzare con esito positivo lo sviluppo e la successiva evoluzione di tale neoplasia (Rose DP and Connolly JM, 1999; Liu J and Ma DW, 2014). Tuttavia, l'effettivo ruolo degli Omega 3 nell'eziologia del carcinoma mammario non è stato ancora del tutto chiarito.

Varie linee cellulari di carcinoma mammario si sono dimostrate un valido modello per lo studio di questi meccanismi, e proprio tra queste sono state selezionate quelle impiegate nel nostro studio (Lacroix M and Leclercq G, 2004). Si tratta di linee cellulari derivate dallo stesso tipo di tessuto (l'epitelio mammario) ma dotate di diverse caratteristiche biochimico-molecolari e diverso grado di trasformazione.

Le cellule MCF-10A sono una linea cellulare epiteliale mammaria immortalizzata ma non cancerosa, che non mostra segni di differenziamento terminale o senescenza. Esse sono cellule diploidi che presentano le caratteristiche tipiche delle cellule duttali luminali ed esprimono gli antigeni specifici del tessuto mammario (Soule *et al.*, 1990).

Le MCF-7, SK-BR-3 e ZR-75-1 sono, invece, linee tumorali epiteliali, largamente usate per studi biologici *in vitro*, le prime due derivate da adenocarcinoma mammario mentre le ultime da carcinoma duttale della mammella. Le MCF-7 e le ZR-75-1 mantengono caratteristiche tipiche dell'epitelio mammario differenziato e conservano la capacità di metabolizzare estradiolo con recettori per gli estrogeni citoplasmatici. Le SK-BR-3 over-esprimono il gene *HER2/c-erb-2* e presentano un fenotipo più sdifferenziato ed invasivo rispetto alle altre due linee. Anche se facili da propagare, queste cellule sono in genere a crescita lenta e hanno tutte subito delle modifiche del numero di cromosomi (Soule HD *et al.*, 1973; Brooks SC, 1973; Trempe GL, 1976; Engel LW *et al.*, 1978).

Le prime analisi, condotte mediante saggi MTT, hanno subito permesso di evidenziare che le diverse linee cellulari, seppure derivate dallo stesso tipo di tessuto, non rispondono al DHA allo stesso modo. È stato possibile discriminare due linee molto sensibili (MCF-10A e SK-BR-3) e due poco sensibili (MCF-7 e ZR-75-1) al DHA, in termini di vitalità cellulare. Questi primi dati sembrerebbero far escludere l'ipotesi che gli effetti del DHA possano essere correlati al grado di trasformazione cellulare, visto che il composto è risultato citotossico sia nei confronti della linea meno trasformata (MCF-10A) sia nei confronti di quella più trasformata (SK-BR-3), e non nei confronti delle due linee con grado di trasformazione intermedio (MCF-7 e ZR-75-1). In alternativa, si deve ipotizzare l'esistenza di una fase intermedia del processo di carcinogenesi, nella quale le cellule acquisiscono caratteristiche (biochimiche e fenotipiche) che le rendono in qualche modo più resistenti agli effetti mediati dal nutriente.

Le analisi citofluorimetriche successive hanno permesso di evidenziare differenze anche nell'ambito delle cellule risultate sensibili al DHA; ovvero queste indagini hanno rivelato che il DHA inibisce la crescita di queste due linee attraverso meccanismi differenti. Considerando il tempo più basso di trattamento (24 h), in cui tali differenze sono risultate più evidenti, si osserva che nelle MCF-10A il DHA agisce prevalentemente sulla progressione del ciclo cellulare, determinando infatti un rapido e consistente blocco nella fase G0/G1; nelle SK-BR-3 invece il composto sembra esercitare prevalentemente il proprio effetto antiproliferativo attraverso l'induzione di mortalità cellulare. In accordo con i test di vitalità, nella linea in cui il DHA ha mostrato una debole citotossicità (MCF-7), non sono state registrate variazioni significative sia della progressione del ciclo cellulare sia dei livelli di apoptosi/necrosi. Le riduzioni delle percentuali di mortalità cellulare (osservate ai tempi più alti di trattamento), suggerirebbero addirittura che, in queste cellule, il DHA potrebbe inibire la morte cellulare, ovvero potrebbe innescare qualche processo cellulare in grado, al contrario di quanto atteso, di provocare l'accensione di meccanismi di sopravvivenza cellulare (Maddika S *et al.*, 2007).

A queste differenze si affiancano quelle riscontrate a livello della fosforilazione delle proteine ERK1 e 2 e STAT3. L'attivazione di tali fattori risulta generalmente accoppiata con un aumento della crescita e della sopravvivenza cellulare. Dunque, la loro inibizione a livello delle SK-BR-3 mediata dal DHA sembra in accordo con gli effetti antiproliferativi registrati. Lo stesso discorso è valido per le piccole riduzioni dei livelli di fosforilazione di questi fattori registrate nelle MCF-7, solo però dopo 24 h di trattamento con DHA. Alquanto inatteso sembra essere invece l'andamento mostrato dalle MCF-10A. In tale linea cellulare infatti, le risposte DHA-mediate di inibizione della crescita sono risultate accoppiate, al contrario, con un incremento dell'attivazione di questi fattori pro-proliferativi. Tuttavia, le analisi successive dei livelli di espressione di p21 (sia a livello della proteina sia a livello del messaggero), hanno permesso di evidenziare la capacità del DHA di stimolare l'espressione di questo inibitore del ciclo cellulare solo nelle MCF-10A.

Sebbene l'attivazione di ERK e STAT3 sia, contrariamente a quanto osservato nelle MCF-10A, comunemente associata ad un aumento della proliferazione cellulare, diversi lavori riportati in letteratura evidenzerebbero che in alcuni casi proprio l'attivazione dei pathway che coinvolgono i due fattori, può essere responsabile di effetti antiproliferativi, giustificando dunque i dati ottenuti (Woods D *et al.*, 1997; Barré B *et al.*, 2003; Giraud S *et al.*, 2004; Donadelli M *et al.*, 2006; Cagnol S and Chambard JC, 2010). Ad esempio, a livello molecolare, le proteine STAT3 funzionano come fattori trascrizionali in grado di up-regolare diversi geni promuoventi la crescita quali c-myc, pim-1 o ciclina D1. Tuttavia STAT3 ha anche dimostrato di presentare funzioni pro-apoptotiche e di attivare l'espressione di p21, che inibisce il ciclo cellulare quando altamente espresso (Giraud S *et al.*, 2002; Giraud S *et al.*, 2004). Ciò suggerisce che STAT3 può anche essere in grado di bloccare la progressione del ciclo cellulare e di prevenire una abnorme proliferazione cellulare. Nelle cellule normali l'espressione STAT3-mediata dei geni che stimolano la proliferazione sarebbe compensata dall'espressione di geni inibitori della crescita, come appunto p21 (Barré B *et al.*, 2003). Dunque, la stimolazione dell'attivazione di STAT3 da parte del DHA nelle MCF-10A potrebbe essere compatibile con l'arresto di tali cellule in fase G0/G1 promosso dallo stesso nutriente, attraverso un aumento dell'espressione di p21, appunto osservato in queste cellule già dopo 2 h di trattamento e non atteso (e difatti non risultato) nelle MCF-7. Inoltre, è noto che la fosforilazione della Ser727 di STAT3 è necessaria per la sua attività di regolatore dell'espressione genica (Wen Z *et al.*, 1995; Yokogami K *et al.*, 2000). Diversi lavori scientifici avrebbero dimostrato

Discussione e conclusioni

che proprio le MAPK ERK costituirebbero tra i principali responsabili di tale fosforilazione (Chung *et al.*, 1997) e questo è in accordo con il precoce incremento della fosforilazione di queste chinasi osservato nelle MCF-10A in risposta ai trattamenti.

Il DHA ha infine dimostrato un'azione differenziale anche sulla regolazione dell'espressione di p53, un inibitore chiave del ciclo cellulare. Visto che esso funziona da fattore trascrizionale di p21, i risultati ottenuti suggerirebbero che anche questa proteina potrebbe essere implicata nell'up-regolazione DHA-mediata di p21 nelle MCF-10A, soprattutto nella sua attivazione precoce (dopo 2 h), visto che l'aumento di p53 stimolato dal DHA tende ad estinguersi nel tempo. L'aumento dei livelli di p53 ottenuto nelle MCF-7, nelle medesime condizioni sperimentali, non essendo associato ad alcun blocco significativo del ciclo cellulare, suggerisce che in questa linea possano intervenire altri meccanismi a valle capaci di interferire e, quindi, di equilibrare gli effetti normalmente indotti da tale fattore. In alternativa, è possibile ammettere che nelle MCF-7 la stimolazione dell'espressione della proteina p53, non corrisponda necessariamente ad un aumento del suo stato di attivazione.

Certamente altre indagini sono necessarie per confermare le diverse ipotesi formulate. Tuttavia, da questo studio emergono una serie di considerazioni:

- innanzitutto, il DHA induce risposte differenziali in cellule derivate dallo stesso tipo di tessuto e anche in linee estratte dallo stesso tipo di tumore, suggerendo che l'azione di questo nutriente più che dal tipo di neoplasia possa dipendere dalle sue caratteristiche biologiche;
- il DHA ha dimostrato di inibire la crescita di una linea di carcinoma mammario con un certo grado di trasformazione, le SK-BR-3, attraverso l'induzione di morte cellulare, presumibilmente mediata da una riduzione dell'attivazione dei pathway pro-proliferativi di ERK e di STAT3. Questi dati sono in accordo con la prospettiva di utilizzare gli n-3 nella prevenzione/terapia delle patologie correlate, in quanto suggeriscono che il DHA sia in grado di ridurre la vitalità di cellule tumorali anche ad uno stadio piuttosto avanzato di trasformazione;
- un effetto antiproliferativo consistente e piuttosto immediato è stato evidenziato anche in una linea mammaria non tumorale (MCF-10A) ma comunque immortalizzata e dunque, eventualmente, paragonabile ad una cellula mammaria che si trovi in uno stadio iniziale di trasformazione. In questo caso, sorprendentemente l'azione inibitoria mediata dal DHA viene indotta attraverso meccanismi molto diversi, ovvero attraverso un rapido blocco del ciclo cellulare in fase G0/G1, l'attivazione dei signaling di ERK e di STAT3 e l'induzione dell'espressione di p21 e p53. Nonostante i diversi meccanismi coinvolti, in alcuni casi addirittura opposti, i risultati ottenuti sembrano nuovamente in linea con l'ipotesi dell'azione antineoplastica degli n-3, suggerendo un potenziale ruolo positivo del DHA anche negli stadi iniziali del processo di trasformazione cellulare; dunque un effetto chemiopreventivo e non solo chemioterapeutico per questo nutriente;
- nelle MCF-7 sono stati invece ottenuti solo deboli effetti sui diversi processi analizzati: sulla vitalità cellulare (anche dopo 72 h di trattamento), sulla progressione del ciclo cellulare, sulla fosforilazione di ERK e STAT3 (solo dopo 24 h di trattamento). Tuttavia, sono state evidenziate, una significativa down-regolazione dell'espressione dell'mRNA di p21 (che non si traduce in una riduzione dei livelli della sua proteina) e una induzione dell'espressione di p53. Dunque, è risultato che nelle MCF-7 gli effetti promossi a livello molecolare dal DHA non si traducono in un effetto sulla crescita e vitalità cellulare.

Discussione e conclusioni

Tutte queste considerazioni messe insieme permettono certamente di concludere che il DHA è in grado di interferire positivamente sia sull'insorgenza sia sullo sviluppo del carcinoma mammario, agendo dunque da nutriente potenzialmente in grado di contribuire sia alla chemioprevenzione sia al trattamento terapeutico di tale tipo di neoplasia. Visto che, in realtà, non in tutte le linee cellulari esaminate sono stati evidenziati tali effetti positivi, si potrebbe supporre che l'azione del DHA non sia in realtà univoca ma possa seguire l'eterogeneità dei diversi casi clinici. Dunque, per questo composto non può essere definito un meccanismo d'azione comune nell'ambito delle patologie neoplastiche, e più nello specifico, in questo caso, nell'ambito del carcinoma mammario. I dati riportati, insieme ad altri già presenti in letteratura, suggeriscono infatti che l'azione del DHA potrebbe essere influenzata dalle caratteristiche biochimiche (metabolismo, stato di attivazione di specifici fattori o enzimi), molecolari (mutazioni geniche, livelli di espressione di specifici geni) e fenotipiche (grado di trasformazione ed invasività) cellulari o da più di queste caratteristiche messe insieme.

Certamente i dati nel loro insieme incoraggiano i filoni di ricerca che sostengono l'importanza della supplementazione, eventualmente anche ad alto dosaggio, di tali nutrienti con la dieta non solo in soggetti sani, dunque a scopo prevalentemente chemiopreventivo, ma anche in soggetti affetti da neoplasie per contribuire ad un decorso positivo della malattia.

Bibliografia

Abbas T, Dutta A. **2009**. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer*, **9(6)**:400-14.

Adhami VM, Khan N, Mukhtar H. **2009**. Cancer chemoprevention by pomegranate: laboratory and clinical evidence. *Nutr Cancer*, **61(6)**:811-5.

Agarwal ML, Agarwal A, Taylor WR, Stark GR. **1995**. p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **92(18)**:8493-7.

Aguilar F, Hussain SP, Cerutti P. **1993**. Aflatoxin B1 induces the transversion of G->T in codon 249 of the p53 tumor suppressor gene in human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **90(18)**:8586-90.

Albert CM, Oh K, Whang W, Manson JE, Chae CU, Stampfer MJ, Willett WC, Hu FB. **2005**. Dietary alpha-linolenic acid intake and risk of sudden cardiac death and coronary heart disease. *Circulation*; **112(21)**:3232-8.

Androutsopoulos VP, Papakyriakou A, Vourloumis D, Tsatsakis AM, Spandidos DA. **2010**. Dietary flavonoids in cancer therapy and prevention: substrates and inhibitors of cytochrome P450 CYP1 enzymes. *Pharmacol Ther*, **126(1)**:9-20.

Antony ML, Singh SV. **2011**. Molecular mechanisms and targets of cancer chemoprevention by garlic-derived bioactive compound diallyl trisulfide. *Indian J Exp Biol*; **49(11)**:805-16.

Arterburn LM, Hall EB, Oken H. **2006**. Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. *Am J Clin Nutr*, **83(6)**:1467S-1476S.

Aune D, Chan DS, Lau R, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E, Norat T. **2011**. Dietary fibre, whole grains, and risk of colorectal cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *BMJ*; **343**:d6617.

Aune D, Chan DS, Lau R, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E, Norat T. **2012**. Carbohydrates, glycemic index, glycemic load, and colorectal cancer risk: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Cancer Causes Control*; **23(4)**:521-35.

Baena Ruiz R, Salinas Hernández P. **2014**. Diet and cancer: risk factors and epidemiological evidence. *Maturitas*; **77(3)**:202-8.

Balmano K, Cook SJ. **2009**. Tumour cell survival signalling by the ERK1/2 pathway. *Cell Death Differ*, **16(3)**:368-77

Bang HO, Dyerberg J, Nielsen AB. **1971**. Plasma lipid and lipoprotein pattern in Greenlandic West-coast Eskimos. *Lancet*, **1(7710)**:1143-5.

Bang HO, Dyerberg J, Nielsen AB. **1971**. Plasma lipid and lipoprotein pattern in Greenlandic West-coast Eskimos. *Lancet*, **1(7710)**:1143-5.

Bibliografia

- Barré B, Avril S, Coqueret O. **2003**. Opposite regulation of myc and p21waf1 transcription by STAT3 proteins. *J Biol Chem*; **278(5)**:2990-6.
- Bartsch H, Nair J, Owen RW. **1999**. Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis*; **20(12)**:2209-18.
- Baselga J, Arteaga CL. **2005**. Critical update and emerging trends in epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *J Clin Oncol*; **23(11)**:2445-59.
- Berquin IM, Min Y, Wu R, Wu J, Perry D, Cline JM, Thomas MJ, Thornburg T, Kulik G, Smith A, Edwards IJ, D'Agostino R, Zhang H, Wu H, Kang JX, Chen YQ. **2007**. Modulation of prostate cancer genetic risk by omega-3 and omega-6 fatty acids. *J Clin Invest*; **117(7)**:1866-75.
- Besson A, Dowdy SF, Roberts JM. **2008**. CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev Cell*; **14(2)**:159-69.
- Bishayee A, Politis T, Darvesh AS. **2010**. Resveratrol in the chemoprevention and treatment of hepatocellular carcinoma. *Cancer Treat Rev*; **36(1)**:43-53.
- Bougnoux P, Hajjaji N, Couet C. **2008**. The lipidome as a composite biomarker of the modifiable part of the risk of breast cancer. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*; **79**:93-96.
- Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. **2000**. STATs in oncogenesis. *Oncogene*; **19(21)**:2474-88.
- Brasky TM, Darke AK, Song X, Tangen CM, Goodman PJ, Thompson IM, Meyskens FL Jr, Goodman GE, Minasian LM, Parnes HL, Klein EA, Kristal AR. Plasma phospholipid fatty acids and prostate cancer risk in the SELECT trial. *J Natl Cancer Inst*; **105(15)**:1132-41.
- Bravi F, Bosetti C, Tavani A, Bagnardi V, Gallus S, Negri E, Franceschi S, La Vecchia C. **2007**. Coffee drinking and hepatocellular carcinoma risk: a meta-analysis. *Hepatology*; **46(2)**:430-5.
- Brenna JT. **2002**. Efficiency of conversion of alpha-linolenic acid to long chain n-3 fatty acids in man. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*; **5(2)**:127-32.
- Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, Darnell JE Jr. **1999**. Stat3 as an oncogene. *Cell*; **98(3)**:295-303.
- Brossard N, Croset M, Pachiardi C, Riou JP, Tayot JL, Lagarde M. **1996**. Retroconversion and metabolism of [¹³C]22:6n-3 in humans and rats after intake of a single dose of [¹³C]22:6n-3-triacylglycerols. *Am J Clin Nutr*; **64(4)**:577-86.
- Burdge GC, Wootton SA. **2002**. Conversion of alpha-linolenic acid to eicosapentaenoic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids in young women. *Br J Nutr*; **88(4)**:411-20.

Bibliografia

- Burke PA, Ling PR, Forse RA, Bistran BR. **1999**. Conditionally essential fatty acid deficiencies in end-stage liver disease. *Nutrition*; **15(4)**:302-4.
- Cagnol S, Chambard JC. **2009**. ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death--apoptosis, autophagy and senescence. *FEBS J*; **277(1)**:2-21.
- Calder PC. **2004**. n-3 Fatty acids and cardiovascular disease: evidence explained and mechanisms explored. *Clin Sci (Lond)*; **107**:1-11.
- Calder PC. **2006**. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr*; **83(6 Suppl)**:1505S-1519S.
- Calviello G, Palozza P, Franceschelli P, Frattucci A, Piccioni E, Tessitore L, Bartoli GM. **1999**. Eicosapentaenoic acid inhibits the growth of liver preneoplastic lesions and alters membrane phospholipid composition and peroxisomal beta-oxidation. *Nutr Cancer*; **34(2)**:206-12.
- Carroll KK, Parenteau HI. **1991**. A proposed mechanism for effects of diet on mammary cancer. *Nutr Cancer*; **16(2)**:79-83.
- Chapkin RS, Hong MY, Fan YY, Davidson LA, Sanders LM, Henderson CE, Barhoumi R, Burghardt RC, Turner ND, Lupton JR. **2002**. Dietary n-3 PUFA alter colonocyte mitochondrial membrane composition and function. *Lipids*; **37(2)**:193-9.
- Chaudhary AK, Nokubo M, Reddy GR, Yeola SN, Morrow JD, Blair IA, Marnett LJ. **1994**. Detection of endogenous malondialdehyde-deoxyguanosine adducts in human liver. *Science*; **265(5178)**:1580-2.
- Chen J, Jackson PK, Kirschner MW, Dutta A. **1995**. Separate domains of p21 involved in the inhibition of Cdk kinase and PCNA. *Nature*; **374(6520)**:386-8.
- Chen JM, Friedman FK, Hyde MJ, Monaco R, Pincus MR. **1999**. Molecular dynamics analysis of the structures of ras-guanine nucleotide exchange protein (SOS) bound to wild-type and oncogenic ras-p21. Identification of effector domains of SOS. *J Protein Chem*; **18(8)**:867-74.
- Chen S, Parmigiani G. **2007**. Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. *J Clin Oncol*; **25(11)**:1329-33.
- Chhabra SK, Souliotis VL, Kyrtopoulos SA, Anderson LM. Nitrosamines, alcohol, and gastrointestinal tract cancer: recent epidemiology and experimentation. *In Vivo*; **10(3)**:265-84.
- Chin YE, Kitagawa M, Su WC, You ZH, Iwamoto Y, Fu XY. **1996**. Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 WAF1/CIP1 mediated by STAT1. *Science*; **272(5262)**:719-22.
- Chung J, Uchida E, Grammer TC, Blenis J. **1997**. STAT3 serine phosphorylation by ERK-dependent and -independent pathways negatively modulates its tyrosine phosphorylation. *Mol Cell Biol*; **17(11)**:6508-16.

Bibliografia

Clària J. **2006**. Regulation of cell proliferation and apoptosis by bioactive lipid mediators. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*; **1(3)**:369-82.

Cockbain AJ, Toogood GJ, Hull MA. **2012**. Omega-3 polyunsaturated fatty acids for the treatment and prevention of colorectal cancer. *Gut*; **61(1)**:135-49.

Corsetto PA, Montorfano G, Zava S, Jovenitti IE, Cremona A, Berra B, Rizzo AM. **2011**. Effects of n-3 PUFAs on breast cancer cells through their incorporation in plasma membrane. *Lipids Health Dis*; **10**:73.

Crowe FL, Appleby PN, Travis RC, Barnett M, Brasky TM, Bueno-de-Mesquita HB, Chajes V, Chavarro JE, Chirlaque MD et al. **2014**. Circulating fatty acids and prostate cancer risk: individual participant meta-analysis of prospective studies. *J Natl Cancer Inst*; **106(9)**.

Cunnane SC, Anderson MJ. **1997**. The majority of dietary linoleate in growing rats is beta-oxidized or stored in visceral fat. *J Nutr*; **127(1)**:146-52.

Dahm CC, Gorst-Rasmussen A, Crowe FL, Roswall N, Tjønneland A, Drogan D, Boeing H, Teucher B, Kaaks R, Adarakis G, Zylis D, Trichopoulou A et al. **2012**. Fatty acid patterns and risk of prostate cancer in a case-control study nested within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Am J Clin Nutr*; **96(6)**:1354-61.

Darnell JE Jr. **1997**. STATs and gene regulation. *Science*; **277(5332)**:1630-5.

DeFazio A, Chiew YE, Sini RL, Janes PW, Sutherland RL. **2000**. Expression of c-erbB receptors, heregulin and oestrogen receptor in human breast cell lines. *Int J Cancer*; **87**: 487-498,

Dennis LK, Snetselaar LG, Smith BJ, Stewart RE, Robbins ME. **2004**. Problems with the assessment of dietary fat in prostate cancer studies. *Am J Epidemiol*; **160(5)**:436-44.

Donadelli M, Dalla Pozza E, Costanzo C, Scupoli MT, Piacentini P, Scarpa A, Palmieri M. **2006**. Increased stability of P21(WAF1/CIP1) mRNA is required for ROS/ERK-dependent pancreatic adenocarcinoma cell growth inhibition by pyrrolidine dithiocarbamate. *Biochim Biophys Acta*; **1763(9)**:917-26.

Dong JY, He K, Wang P, Qin LQ. **2011**. Dietary fiber intake and risk of breast cancer: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Am J Clin Nutr*; **94(3)**:900-5.

Dong JY, Qin LQ. **2011**. Dietary glycemic index, glycemic load, and risk of breast cancer: meta-analysis of prospective cohort studies. *Breast Cancer Res Treat*; **126(2)**:287-94.

Doughman SD, Krupanidhi S, Sanjeevi CB. **2007**. Omega-3 fatty acids for nutrition and medicine: considering microalgae oil as a vegetarian source of EPA and DHA. *Curr Diabetes Rev*; **3(3)**:198-203.

Bibliografia

Dawson PJ, Wolman SR, Tait L, Heppner GH, Miller FR. **1996**. MCF10AT: a model for the evolution of cancer from proliferative breast disease. *Am J Pathol*; **148(1)**:313-9.

Duplus E, Glorian M, Forest C. **2000**. Fatty acid regulation of gene transcription. *J Biol Chem*; **275(40)**:30749-52.

el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. **1993**. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*; **75(4)**:817-25.

Engel LW, Young NA, Tralka TS, Lippman ME, O'Brien SJ, Joyce MJ. **1978**. Establishment and characterization of three new continuous cell lines derived from human breast carcinomas. *Cancer Res*; **38(10)**:3352-64.

Escrich E, Moral R, Grau L, Costa I, Solanas M. **2007**. Molecular mechanisms of the effects of olive oil and other dietary lipids on cancer. *Mol Nutr Food Res*; **51(10)**:1279-92.

Fay MP, Freedman LS. **1997**. Meta-analyses of dietary fats and mammary neoplasms in rodent experiments. *Breast Cancer Res Treat*; **46**:215-223.

Fay MP, Freedman LS, Clifford CK, Midthune DN. **1997**. Effect of different types and amounts of fat on the development of mammary tumors in rodents: a review. *Cancer Res*; **57(18)**:3979-88.

Fedirko V, Tramacere I, Bagnardi V, Rota M, Scotti L, Islami F, Negri E, Straif K, Romieu I, La Vecchia C, Boffetta P, Jenab M. **2011**. Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies. *Ann Oncol*; **22(9)**:1958-72.

Gartel AL, Tyner AL. **1999**. Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene. *Exp Cell Res*; **246(2)**:280-9.

Gartel AL, Tyner AL. **2002**. The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther*; **1(8)**:639-49.

Gerber M. **2009**. Background review paper on total fat, fatty acid intake and cancers. *Ann Nutr Metab*; **55(1-3)**:140-61.

Gerber M. **2012**. Omega-3 fatty acids and cancers: a systematic update review of epidemiological studies. *Br J Nutr*; **107 Suppl 2**:S228-39.

Gerster H. **1998**. Can adults adequately convert alpha-linolenic acid (18:3n-3) to eicosapentaenoic acid (20:5n-3) and docosahexaenoic acid (22:6n-3)? *Int J Vitam Nutr Res*; **68(3)**:159-73.

Giraud S, Bienvenu F, Avril S, Gascan H, Heery DM, Coqueret O. **2002**. Functional interaction of STAT3 transcription factor with the coactivator NcoA/SRC1a. *J Biol Chem*; **277(10)**:8004-11.

Bibliografia

- Giraud S, Hurlstone A, Avril S, Coqueret O. **2004**. Implication of BRG1 and cdk9 in the STAT3-mediated activation of the p21waf1 gene. *Oncogene*; **23(44)**:7391-8.
- Glauert HP, Calfee-Mason K, Stemm DN, Tharappel JC, Spear BT. **2010**. Dietary antioxidants in the prevention of hepatocarcinogenesis: a review. *Mol Nutr Food Res*; **54(7)**:875-96.
- Goldman R, Shields PG. **2003**. Food mutagens. *J Nutr. Mar*; 133 Suppl 3:965-973.
- Goldstein BY, Chang SC, Hashibe M, La Vecchia C, Zhang ZF. **2010**. Alcohol consumption and cancers of the oral cavity and pharynx from 1988 to 2009: an update. *Eur J Cancer Prev*; **19(6)**:431-65.
- Greenwald P1, Clifford CK, Milner JA. **2001**. Diet and cancer prevention. *Eur J Cancer*; **37(8)**:948-65.
- Guillou H, Zadravec D, Martin PG, Jacobsson A. **2010**. The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Prog Lipid Res*; **49(2)**:186-99.
- Habermann N, Christian B, Luckas B, Pool-Zobel BL, Lund EK, Gleis M. **2009**. Effects of fatty acids on metabolism and cell growth of human colon cell lines of different transformation state. *Biofactors*; **35(5)**:460-7.
- Henning SM, Wang P, Heber D. **2011**. Chemopreventive effects of tea in prostate cancer: green tea versus black tea. *Mol Nutr Food Res*; **55(6)**:905-20.
- Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, He TC, Zhang L, Thiagalingam S, Kinzler KW, Vogelstein B. **1997**. 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell*; **1(1)**:3-11.
- Hirsch HA, Iliopoulos D, Joshi A, Zhang Y, Jaeger SA, Bulyk M, Tschlis PN, Shirley Liu X, Struhl K. **2010**. A transcriptional signature and common gene networks link cancer with lipid metabolism and diverse human diseases. *Cancer Cell*; **17(4)**:348-61.
- Hu Y, Sun H, Owens RT, Gu Z, Wu J, Chen YQ, O'Flaherty JT, Edwards IJ. **2010**. Syndecan-1-dependent suppression of PDK1/Akt/bad signaling by docosahexaenoic acid induces apoptosis in prostate cancer. *Neoplasia*; **12(10)**:826-36.
- Humphreys RC, Lydon J, O'Malley BW, Rosen JM. **1997**. Mammary gland development is mediated by both stromal and epithelial progesterone receptors. *Mol Endocrinol*; **11(6)**:801-11.
- Hunter DJ, Spiegelman D, Adami HO, Beeson L, et al. **1996**. Cohort studies of fat intake and the risk of breast cancer – a pooled analysis. *N Engl J Med*; **334**:356-61.

Bibliografia

Hunter DJ. **1999**. Role of dietary fat in the causation of breast cancer: counterpoint. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; **8**:9-13.

Hwang D. **2000**. Fatty acids and immune responses--a new perspective in searching for clues to mechanism. *Annu Rev Nutr*; **20**:431-56.

Ibiebele TI, Nagle CM, Bain CJ, Webb PM. **2012**. Intake of omega-3 and omega-6 fatty acids and risk of ovarian cancer. *Cancer Causes Control*; **23(11)**:1775-83.

Ihle JN, Kerr IM. **1995**. Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet*; **11(2)**:69-74.

Irwin MS, Kaelin WG. **2001**. p53 family update: p73 and p63 develop their own identities. *Cell Growth Differ*; **12(7)**:337-49.

Jakszyn P, Gonzalez CA. **2006**. Nitrosamine and related food intake and gastric and oesophageal cancer risk: a systematic review of the epidemiological evidence. *World J Gastroenterol*; **12(27)**:4296-303.

Jarvinen TA, Tanner M, Rantanen V, Barlund M, Borg A, Grenman S, Isola J. **2000**. Amplification and deletion of topoisomerase II alpha associate with ErbB-2 amplification and affect sensitivity to topoisomerase II inhibitor doxorubicin in breast cancer. *Am J Pathol*; **156**: 839-47,

Jump DB, Thelen A, Ren B, Mater M. **1999**. Multiple mechanisms for polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*; **60(5-6)**:345-9.

Jasiński M, Jasińska L, Ogródowczyk M. **2013**. Resveratrol in prostate diseases - a short review. *Cent European J Urol*; **66(2)**:144-9.

Johnston PA, Grandis JR. **2011**. STAT3 signaling: anticancer strategies and challenges. *Mol Interv*; **11(1)**:18-26.

Jump DB. **2002**. The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem*; **277(11)**:8755-8.

Kauraniemi P, Barlund M, Monni O, Kallioniemi A. **2001**. New amplified and highly expressed genes discovered in the ERBB2 amplicon in breast cancer by cDNA microarrays. *Cancer Res*; **61**: 8235-40.

Khan NA, Nishimura K, Aires V, Yamashita T, Oaxaca-Castillo D, Kashiwagi K, Igarashi K. **2006**. Docosahexaenoic acid inhibits cancer cell growth via p27Kip1, CDK2, ERK1/ERK2, and retinoblastoma phosphorylation. *J Lipid Res*; **47(10)**:2306-13.

Khan N, Mukhtar H. **2010**. Cancer and metastasis: prevention and treatment by green tea. *Cancer Metastasis Rev*; **29(3)**:435-45.

Bibliografia

- Kolonel LN, Nomura AM, Cooney RV. **1999**. Dietary fat and prostate cancer: current status. *J Natl Cancer Inst*; **91(5)**:414-28.
- Kritchevsky D. **1992**. Caloric restriction and experimental carcinogenesis. *Adv Exp Med Biol*; **322**:131-41.
- Kuriki K, Hirose K, Wakai K, Matsuo K, Ito H, Suzuki T, Hiraki A, Saito T, Iwata H, Tatematsu M, Tajima K. **2007**. Breast cancer risk and erythrocyte compositions of n-3 highly unsaturated fatty acids in Japanese. *Int J Cancer*; **121(2)**:377-85.
- Kushi L, Giovannucci E. **2002**. Dietary fat and cancer. *Am J Med*; 113 Suppl 9B:63S-70S.
- Kwan ML, Kushi LH, Weltzien E, Tam EK, Castillo A, Sweeney C, Caan BJ. **2010**. Alcohol consumption and breast cancer recurrence and survival among women with early-stage breast cancer: the life after cancer epidemiology study. *J Clin Oncol*; **28(29)**:4410-6.
- Lacroix M, Leclercq G. **2004**. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Res Treat*; **83(3)**:249-89.
- La Guardia M, Giammanco M. **2001**. Breast cancer and obesity. *Panminerva Med*; **43(2)**:123-33.
- Lands WE, Libelt B, Morris A, Kramer NC, Prewitt TE, Bowen P, Schmeisser D, Davidson MH, Burns JH. **1992**. Maintenance of lower proportions of (n - 6) eicosanoid precursors in phospholipids of human plasma in response to added dietary (n - 3) fatty acids. *Biochim Biophys Acta*; **1180(2)**:147-62.
- Larsson SC, Kumlin M, Ingelman-Sundberg M, Wolk A. **2004**. Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. *Am J Clin Nutr*; **79(6)**:935-45.
- Larsson SC, Wolk A. **2007**. Coffee consumption and risk of liver cancer: a meta-analysis. *Gastroenterology*; **132(5)**:1740-5.
- Lasfargues EY, Ozzello L. **1958**. Cultivation of human breast carcinomas. *J Natl Cancer Inst*; **21(6)**:1131-47.
- Laviano A, Rianda S, Molfino A, Rossi Fanelli F. **2013**. Omega-3 fatty acids in cancer. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*; **16(2)**:156-61.
- Leaf A. **2001**. Electrophysiologic basis for the antiarrhythmic and anticonvulsant effects of omega 3 polyunsaturated fatty acids. *World Rev Nutr Diet*; **88**:72-8.
- Leclercq G. **2002**. Molecular forms of the estrogen receptor in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*; **80**:259-72.
- Lee MM1, Lin SS. **2000**. Dietary fat and breast cancer. *Annu Rev Nutr*; **20**:221-48.

Bibliografia

Li Y, Chang SC, Goldstein BY, Scheider WL, Cai L, You NC, Tarleton HP, Ding B, Zhao J, Wu M, Jiang Q, Yu S, Rao J, Lu QY, Zhang ZF. 2011. Green tea consumption, inflammation and the risk of primary hepatocellular carcinoma in a Chinese population. *Cancer Epidemiol*; **35(4)**:362-8.

Lijinsky W1, Saavedra JE, Kovatch RM. 1990. Carcinogenesis in rats by nitrosodialkylureas containing oxygenated alkyl groups. *In Vivo*; **4(1)**:1-5.

Lin DS, Conner WE. 1990. Are the n-3 fatty acids from dietary fish oil deposited in the triglyceride stores of adipose tissue? *Am J Clin Nutr*; **51(4)**:535-9.

Liu G, Bibus DM, Bode AM, Ma WY, Holman RT, Dong Z. 2001. 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.*; **98(13)**:7510-15.

Ljungman M. 2000. Dial 9-1-1 for p53: mechanisms of p53 activation by cellular stress. *Neoplasia*; **2(3)**:208-25.

Lodish et al. 2004. *Molecular Cell Biology*, 5^o ed., W.H. Freeman and Company.

Loft S, Poulsen HE. 1996. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J Mol Med (Berl)*; **74(6)**:297-312.

Luo Y, Hurwitz J, Massagué J. 1995. Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21Cip1. *Nature*; **375(6527)**:159-61.

Maddika S, Ande SR, Panigrahi S, Paranjothy T, Weglarczyk K, Zuse A, Eshraghi M, Manda KD, Wiechec E, Los M. 2007. Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy. *Drug Resist Updat*; **10(1-2)**:13-29.

Mally A. 2012. Ochratoxin a and mitotic disruption: mode of action analysis of renal tumor formation by ochratoxin A. *Toxicol Sci*; **127(2)**:315-30.

McIntyre TM. 2012. Bioactive oxidatively truncated phospholipids in inflammation and apoptosis: formation, targets, and inactivation. *Biochim Biophys Acta*; **1818(10)**:2456-64.

Merendino N, Costantini L, Manzi L, Molinari R, D'Eliseo D, Velotti F. 2013. Dietary ω -3 polyunsaturated fatty acid DHA: a potential adjuvant in the treatment of cancer. *Biomed Res Int*; 2013:310186.

Moldovan GL, Pfander B, Jentsch S. 2007. PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell*; **129(4)**:665-79.

Morgan TR, Mandayam S, Jamal MM. 2004. Alcohol and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*; **127(5 Suppl 1)**:S87-96.

Nagata C, Nakamura K, Wada K, Oba S, Hayashi M, Takeda N, Yasuda K. 2010. Association of dietary fat, vegetables and antioxidant micronutrients with skin ageing in Japanese women. *Br J Nutr*; **103(10)**:1493-8.

Bibliografia

- Mori TA, Burke V, Puddey IB, Watts GF, O'Neal DN, Best JD, Beilin LJ. **2000**. Purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids have differential effects on serum lipids and lipoproteins, LDL particle size, glucose, and insulin in mildly hyperlipidemic men. *Am J Clin Nutr*; **71(5)**:1085-94.
- Murphy LO, Blenis J. **2006**. MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends Biochem Sci*; **31(5)**:268-75.
- Nannicini F. **2008**. La Dieta Omegabyte. Ed Carlo Zella.
- Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N. **2005**. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem Biophys Res Commun*; **338(1)**:668-76.
- Noel SE, Stoneham AC, Olsen CM, Rhodes LE, Green AC. **2014**. Consumption of omega-3 fatty acids and the risk of skin cancers: a systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer*; **135(1)**:149-56.
- Nomura DK, Long JZ, Niessen S, Hoover HS, Ng SW, Cravatt BF. **2010**. Monoacylglycerol lipase regulates a fatty acid network that promotes cancer pathogenesis. *Cell*; **140(1)**:49-61.
- Oomen CM, Ocké MC, Feskens EJ, Kok FJ, Kromhout D. **2001**. alpha-Linolenic acid intake is not beneficially associated with 10-y risk of coronary artery disease incidence: the Zutphen Elderly Study. *Am J Clin Nutr*; **74(4)**:457-63.
- O'Neill JS, Elton RA, Miller WR. **1988**. Aromatase activity in adipose tissue from breast quadrants: a link with tumour site. *Br Med J (Clin Res Ed)*; **296(6624)**:741-3.
- Ozturk G, Ginis Z, Akyol S, Erden G, Gurel A, Akyol O. **2012**. The anticancer mechanism of caffeic acid phenethyl ester (CAPE): review of melanomas, lung and prostate cancers. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*; **16(15)**:2064-8.
- Patterson RE, Flatt SW, Newman VA, Natarajan L, Rock CL, Thomson CA, Caan BJ, Parker BA, Pierce JP. **2011**. Marine fatty acid intake is associated with breast cancer prognosis. *J Nutr*; **141(2)**:201-6.
- Peto J, Collins N, Barfoot R, Seal S, Warren W, Rahman N, Easton DF, Evans C, Deacon J, Stratton MR. **1999**. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in patients with early-onset breast cancer. *J Natl Cancer Inst*; **91(11)**:943-9.
- Radhakrishnan SK, Feliciano CS, Najmabadi F, Haegebarth A, Kandel ES, Tyner AL, Gartel AL. **2004**. Constitutive expression of E2F-1 leads to p21-dependent cell cycle arrest in S phase of the cell cycle. *Oncogene*; **23(23)**:4173-6.
- Ramos JW. **2008**. The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol*; **40(12)**:2707-19.
- Reddy BS, Burill C, Rigotty J. **1991**. Effect of diets high in omega-3 and omega-6 fatty acids on initiation and postinitiation stages of colon carcinogenesis. *Cancer Res*; **51(2)**:487-91.

Bibliografia

Reddy BS. **1992**. Dietary fat and colon cancer: animal model studies. *Lipids*; **27(10)**:807-13.

Rhodes LE1, Shahbakhti H, Azurdia RM, Moison RM, Steenwinkel MJ, Homburg MI, Dean MP, McArdle F, Beijersbergen van Henegouwen GM, Epe B, Vink AA. **2003**. Effect of eicosapentaenoic acid, an omega-3 polyunsaturated fatty acid, on UVR-related cancer risk in humans. An assessment of early genotoxic markers. *Carcinogenesis*; **24(5)**:919-25.

Riediger ND, Othman RA, Suh M, Moghadasian MH. **2009**. A systemic review of the roles of n-3 fatty acids in health and disease. *J Am Diet Assoc*; **109(4)**:668-79.

Rizos Ch, Papassava M, Goliass Ch, Charalabopoulos K. **2010**. Alcohol consumption and prostate cancer: a mini review. *Exp Oncol*; **32(2)**:66-70.

Rose DP. **1997**. Effects of dietary fatty acids on breast and prostate cancers: evidence from in vitro experiments and animal studies. *Am. J. Clin. Nutr*; **66**: 1513-22.

Rose DP, Connolly JM. **1999**. Antiangiogenicity of docosahexaenoic acid and its role in the suppression of breast cancer cell growth in nude mice. *J Oncol*; **15(5)**:1011-5.

Rose DP, Connolly JM. **1999**. Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. *Pharmacol Ther*; **83(3)**:217-44.

Ross JS, Fletcher JA. **1998**. The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Stem Cells*; **16(6)**:413-28.

Salem N Jr, Litman B, Kim HY, Gawrisch K. **2001**. Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system. *Lipids*; **36(9)**:945-59.

Sanchez GV, Weinstein SJ, Stolzenberg-Solomon RZ. **2012**. Is dietary fat, vitamin D, or folate associated with pancreatic cancer? *Mol Carcinog*; **51(1)**:119-27.

Sander J, Schweinsberg F. **1972**. Interrelationships between nitrate, nitrite, and carcinogenic N-nitroso-compounds. 1. Nitrate, nitrite, and nitrosable amino-compounds in food and drugs, chemistry of N-nitroso-compounds. *Zentralbl Bakteriol Orig B*; **156(4)**:299-320.

Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. **2012**. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*; **9**:671-75.

Schuller HM. **1997**. Nasal cavity carcinogenesis by N-nitrosamines: a critical appraisal. *Mutat Res*; **380(1-2)**:13-8.

Schütze M1, Boeing H, Pischon T, Rehm J, Kehoe T, Gmel G, Olsen A, Tjønneland AM, Dahm CC, Overvad K, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Trichopoulou A, Benetou V, Zylis D et al. **2011**. Alcohol attributable burden of incidence of cancer in eight European countries based on results from prospective cohort study. *BMJ*; **342**:d1584.

Bibliografia

Senadheera SD, Turchini GM, Thanuthong T, Francis DS. **2011**. Effects of dietary α -linolenic acid (18:3n-3)/linoleic acid (18:2n-6) ratio on fatty acid metabolism in Murray cod (*Maccullochella peelii peelii*). *J Agric Food Chem*; **59(3)**:1020-30.

Serini S, Trombino S, Oliva F, Piccioni E, Monego G, Resci F, Boninsegna A, Picci N, Ranelletti FO, Calviello G. **2008**. Docosahexaenoic acid induces apoptosis in lung cancer cells by increasing MKP-1 and down-regulating p-ERK1/2 and p-p38 expression. *Apoptosis*; **13(9)**:1172-83.

Shaikh SR, Edidin M. **2006**. Polyunsaturated fatty acids, membrane organization, T cells, and antigen presentation. *Am J Clin Nutr*; **84(6)**:1277-89.

Shen XJ, Zhou JD, Dong JY, Ding WQ, Wu JC. **2012**. Dietary intake of n-3 fatty acids and colorectal cancer risk: a meta-analysis of data from 489 000 individuals. *Br J Nutr*; **108(9)**:1550-6.

Shimizu M, Adachi S, Masuda M, Kozawa O, Moriwaki H. **2011**. Cancer chemoprevention with green tea catechins by targeting receptor tyrosine kinases. *Mol Nutr Food Res*; **55(6)**:832-43.

Siddiqui RA, Jenski LJ, Neff K, Harvey K, Kovacs RJ, Stillwell W. **2001**. Docosahexaenoic acid induces apoptosis in Jurkat cells by a protein phosphatase-mediated process. *Biochim Biophys Acta*; **1499(3)**:265-75.

Simopoulos AP. **2008**. The omega-6/omega-3 fatty acid ratio, genetic variation, and cardiovascular disease. *Asia Pac J Clin Nutr*; **17 Suppl 1**:131-4.

Singh J, Hamid R, Reddy BS. **1997**. Dietary fat and colon cancer: modulation of cyclooxygenase-2 by types and amount of dietary fat during the postinitiation stage of colon carcinogenesis. *Cancer Res*; **57(16)**:3465-70.

Smits VA, Klompmaker R, Vallenius T, Rijkssen G, Mäkela TP, Medema RH. **2000**. p21 inhibits Thr161 phosphorylation of Cdc2 to enforce the G2 DNA damage checkpoint. *J Biol Chem*; **275(39)**:30638-43.

So JY, Lee HJ, Kramata P, Minden A, Suh N. **2012**. Differential Expression of Key Signaling Proteins in MCF10 Cell Lines, a Human Breast Cancer Progression Model. *Mol Cell Pharmacol*; **4(1)**:31-40.

Sommers CL, Byers SW, Thompson EW, Torri JA, Gelmann EP. **1994**. Differentiation state and invasiveness of human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat*; **31(2-3)**:325-35.

Song KS, Jing K, Kim JS, Yun EJ, Shin S, Seo KS, Park JH, Heo JY, Kang JX, Suh KS, Wu T, Park JI, Kweon GR, Yoon WH, Hwang BD, Lim K. **2011**. Omega-3-polyunsaturated fatty acids suppress pancreatic cancer cell growth in vitro and in vivo via downregulation of Wnt/Beta-catenin signaling. *Pancreatol*; **11(6)**:574-84.

Song M, Chan AT, Fuchs CS, Ogino S, Hu FB, Mozaffarian D, Ma J, Willett WC, Giovannucci EL, Wu K. **2014**. Dietary intake of fish, ω -3 and ω -6 fatty acids and

Bibliografia

risk of colorectal cancer: A prospective study in U.S. men and women. *Int J Cancer*; **135(10)**:2413-23.

Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. **1973**. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*; **51(5)**:1409-16.

Soule HD, Maloney TM, Wolman SR, Peterson WD Jr, Brenz R, McGrath CM, Russo J, Pauley RJ, Jones RF, Brooks SC. **1990**. Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Res*; **50(18)**:6075-86.

Spector AA. **1999**. Essentiality of fatty acids. *Lipids*; **34** Suppl:S1-3.

Stillwell W, Wassall SR. **2003**. Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. *Chem Phys Lipids*; **126(1)**:1-27.

Stockmann-Juvala H, Mikkola J, Naarala J, Loikkanen J, Elovaara E, Savolainen K. **2004**. Oxidative stress induced by fumonisin B1 in continuous human and rodent neural cell cultures. *Free Radic Res*; **38(9)**:933-42.

Strokin M, Sergeeva M, Reiser G. **2003**. Docosahexaenoic acid and arachidonic acid release in rat brain astrocytes is mediated by two separate isoforms of phospholipase A2 and is differently regulated by cyclic AMP and Ca²⁺. *Br J Pharmacol*; **139(5)**:1014-22.

Storlien LH, Hulbert AJ, Else PL. **1998**. Polyunsaturated fatty acids, membrane function and metabolic diseases such as diabetes and obesity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*; **1(6)**:559-63.

Sugimura T. **2000**. Nutrition and dietary carcinogens. *Carcinogenesis*; **21(3)**:387-95.

Sugimura T. **2002**. Food and cancer. *Toxicology*; **181-182**:17-21.

Tan HL, Thomas-Ahner JM, Grainger EM, Wan L, Francis DM, Schwartz SJ, Erdman JW Jr, Clinton SK. **2010**. Tomato-based food products for prostate cancer prevention: what have we learned? *Cancer Metastasis Rev*; **29(3)**:553-68.

Tavani A, Pelucchi C, Parpinel M, Negri E, Franceschi S, Levi F, La Vecchia C. **2003**. n-3 polyunsaturated fatty acid intake and cancer risk in Italy and Switzerland. *Int J Cancer*; **105(1)**:113-6.

Tong LX, Young LC. **2014**. Nutrition: the future of melanoma prevention? *J Am Acad Dermatol*; **71(1)**:151-60.

Trempe GL. **1976**. Human breast cancer in culture. *Recent Results Cancer Res*; **(57)**:33-41.

Trottier G, Boström PJ, Lawrentschuk N, Fleshner NE. **2010**. Nutraceuticals and prostate cancer prevention: a current review. *Nat Rev Urol*; **7(1)**:21-30.

Bibliografia

- Ueng YF, Shimada T, Yamazaki H, Guengerich FP. **1995**. Oxidation of aflatoxin B1 by bacterial recombinant human cytochrome P450 enzymes. *Chem Res Toxicol*; **8(2)**:218-25.
- Verschuren WM. **2012**. Diet and cardiovascular disease. *Curr Cardiol Rep*; **14(6)**:701-8.
- Vousden KH, Lu X. **2002**. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer*; **2(8)**:594-604.
- Waldman T, Kinzler KW, Vogelstein B. **1995**. p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res*; **55(22)**:5187-90.
- Wall R, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. **2010**. Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. *Nutr Rev*; **68(5)**:280-9.
- Wallingford SC, Hughes MC, Green AC, van der Pols JC. **2013**. Plasma omega-3 and omega-6 concentrations and risk of cutaneous basal and squamous cell carcinomas in Australian adults. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; **22(10)**:1900-5.
- Wang H, Dick R, Yin H, Licad-Coles E, Kroetz DL, Szklarz G, Harlow G, Halpert JR, Correia MA. **1998**. Structure-function relationships of human liver cytochromes P450 3A: aflatoxin B1 metabolism as a probe. *Biochemistry*; **37(36)**:12536-45.
- Wang P, Zhang K, Zhang Q, Mei J, Chen CJ, Feng ZZ, Yu DH. **2012**. Effects of quercetin on the apoptosis of the human gastric carcinoma cells. *Toxicol In Vitro*; **26(2)**:221-8.
- Wang S, Wu J, Suburu J, Gu Z, Cai J, Axanova LS, Cramer SD, Thomas MJ, Perry DL, Edwards IJ, Mucci LA, Sinnott JA, Loda MF, Sui G, Berquin IM, Chen YQ. **2012**. Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on castration-resistant Pten-null prostate cancer. *Carcinogenesis*; **33(2)**:404-12.
- Wen Z, Zhong Z, Darnell JE Jr. **1995**. Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell*; **82(2)**:241-50.
- Wicki A, Hagmann J. **2011**. Diet and cancer. *Swiss Med Wkly*; 141:w13250.
- Willett WC. **2000**. Diet and cancer. *Oncologist*; **5(5)**:393-404.
- Wynder EL, Cohen LA, Muscat JE, Winters B, et al. **1997**. Breast cancer: weighting the evidence for a promoting role of dietary fat. *J Natl Cancer Inst*; **89**:766-75.
- Woods D, Parry D, Cherwinski H, Bosch E, Lees E, McMahon M. **1997**. Raf-induced proliferation or cell cycle arrest is determined by the level of Raf activity with arrest mediated by p21Cip1. *Mol Cell Biol*; **17(9)**:5598-611.

Bibliografia

Yokogami K, Wakisaka S, Avruch J, Reeves SA. **2000**. Serine phosphorylation and maximal activation of STAT3 during CNTF signaling is mediated by the rapamycin target mTOR. *Curr Biol*; **10(1)**:47-50.

Yoo JY, Wang W, Desiderio S, Nathans D. **2001**. Synergistic activity of STAT3 and c-Jun at a specific array of DNA elements in the alpha 2-macroglobulin promoter. *J Biol Chem*; **276(28)**:26421-9.

Zhan Q, Antinore MJ, Wang XW, Carrier F, Smith ML, Harris CC, Fornace AJ Jr. **1999**. Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45. *Oncogene*; **18(18)**:2892-900.

Zhang X, Darnell JE Jr. **2001**. Functional importance of Stat3 tetramerization in activation of the alpha 2-macroglobulin gene. *J Biol Chem*; **276(36)**:33576-81.

Zhou J, Ahn J, Wilson SH, Prives C. **2001**. A role for p53 in base excision repair. *EMBO J*; **20(4)**:914-23.

Zhu W, Abbas T, Dutta A. **2005**. DNA replication and genomic instability. *Adv Exp Med Biol*; **570**:249-79.

Sezione speciale: Studio degli effetti molecolari di campi elettrici e magnetici sui sistemi biologici

Di recente è stato osservato che i campi elettromagnetici pulsati (CEMP) sono in grado di influenzare positivamente i processi osteogenetici propri del fenomeno di rigenerazione ossea (Tsai MT *et al.*, 2009; Jansen JH *et al.*, 2010; Saino E. *et al.*, 2011; Luo F *et al.*, 2012). Difatti, diversi studi riportano la capacità di tali stimoli fisici di influenzare la proliferazione ed il differenziamento di cellule ossee *in vitro*, di incrementare l'espressione di geni implicati nell'osteogenesi e di stimolare i processi di mineralizzazione ossea (De Mattei M *et al.*, 1999; Fassina L *et al.*, 2006; Selvamurugan N *et al.*, 2007). Tutte queste evidenze sperimentali hanno certamente incentivato la ricerca nell'ambito dello sviluppo di dispositivi in grado di generare segnali di questo tipo, ovviamente biocompatibili, da impiegare in ambito terapeutico ed in particolare per il trattamento di fratture o di patologie ossee richiedenti proprio processi rigenerativi per la propria risoluzione.

Sicuramente risulta interessante la comprensione dei meccanismi molecolari, biochimici e cellulari alla base degli effetti benefici indotti da tali segnali sui processi considerati e di cui si sa ancora molto poco.

Durante lo svolgimento del progetto principale di dottorato è stata anche svolta un'attività di ricerca volta all'analisi degli effetti molecolari del segnale generato da un dispositivo, messo a disposizione dalla IGEA S.p.a. (Carpi, MO), di corrente uso clinico per il trattamento di fratture o di specifiche patologie ossee. Si tratta di un generatore di campo magnetico a bassa frequenza (ELF), il PEMF Power Supply. Lo strumento (frequenza 75 Hz, ampiezza del segnale 1.5 mT, burst 10%, duty cycle 10%) è stato adattato specificamente per sperimentazioni scientifiche *in vitro* (Fig. 1). Per tali scopi, infatti, le sue bobine sono collocate all'interno di un apposito supporto e, in tal modo, mantenute ad una appropriata distanza. Il supporto presenta anche un alloggiamento per una multiwell per colture cellulari, realizzato in modo tale che essa venga a trovarsi proprio tra le due spire del solenoide (Fig. 1).



Figura 1. PEMF Power Supply e sistema di esposizione.

Di seguito sono riportati solo i dati principali ottenuti nell'ambito di questo studio.

Come linea cellulare di riferimento per questo tipo di analisi è stata impiegata la linea di osteosarcoma umano SaoS-2, che costituisce proprio un modello *in vitro* di tessuto osseo umano ampiamente utilizzato in ambito scientifico (Rodan SB *et al.*, 1987).

Per tutte le nostre indagini, sono state condotte esposizioni delle cellule al campo magnetico di 1 ora a temperatura ambiente. Ogni analisi è stata poi condotta diversi tempi dopo l'esposizione, ovvero immediatamente, 4 e 24 ore dopo l'esposizione. È stato scelto questo tipo di schema sperimentale allo scopo di stabilire se gli effetti indotti a livello cellulare dai segnali fossero immediati o ritardati nel tempo e se gli effetti immediati si mantenessero oppure tendessero ad esaurirsi nel tempo. I controlli (Sham) per le nostre sperimentazioni sono stati realizzati sottoponendo le cellule allo stesso *iter* delle cellule stimulate senza però esporle al campo magnetico; ovvero inserendo la multiwell tra le due spire del solenoide, lasciando l'apparecchio spento.

In primo luogo, è stato valutato se il campo magnetico generato dal PEMF *Power Supply* fosse in grado di interferire con la vitalità e la crescita cellulare. A tale scopo è stato condotto il saggio colorimetrico standard MTT in cellule di controllo e in cellule esposte per un'ora al campo magnetico. In particolare il numero di cellule vitali è stato determinato 0, 4 e 24 ore dopo l'esposizione. Tutte le quantizzazioni realizzate hanno permesso di concludere che il segnale generato dal nostro apparato non è in grado di influenzare la vitalità e la proliferazione delle SaoS-2 (dato non mostrato).

La fosfatasi alcalina (ALP) è una proteina enzimatica che svolge un ruolo chiave nella formazione dei tessuti duri e risulta, infatti, altamente espressa nelle cellule di tessuti mineralizzati. La sua attività enzimatica è inoltre considerata un marker dell'andamento dei processi di osteogenesi e di rigenerazione ossea (Martino *et al.*, 2008).

Successivamente è stato, dunque, valutato l'effetto dell'esposizione della nostra linea cellulare di riferimento allo stesso segnale sull'attività della fosfatasi alcalina. Anche in questo caso i livelli di attività di tale enzima sono stati esaminati immediatamente, 4 e 24 ore dopo l'esposizione. Tale attività enzimatica è stata misurata mediante il saggio p-NPP basato su una determinazione colorimetrica. La fosfatasi alcalina infatti catalizza l'idrolisi del p-NPP (p-nitrofenilfosfato) in p-NP (p-nitrofenolo) e ortofosfato in ambiente alcalino, con una transizione del colore della soluzione di reazione dal trasparente al giallo (p-NP) (Moss DW, 1982). La produzione di p-NP risulta proporzionale allo stato di attivazione dell'enzima e può essere valutata mediante misura dell'assorbanza a 405 nm. In queste condizioni, i valori ottenuti risultano proporzionali alla concentrazione del composto.

Dai grafici riportati in Fig. 2 risulta evidente come l'esposizione al campo magnetico sia stata in grado di indurre nelle SaoS-2 un significativo incremento di attività della fosfatasi alcalina, già subito dopo e fino a 24 h di trattamento.

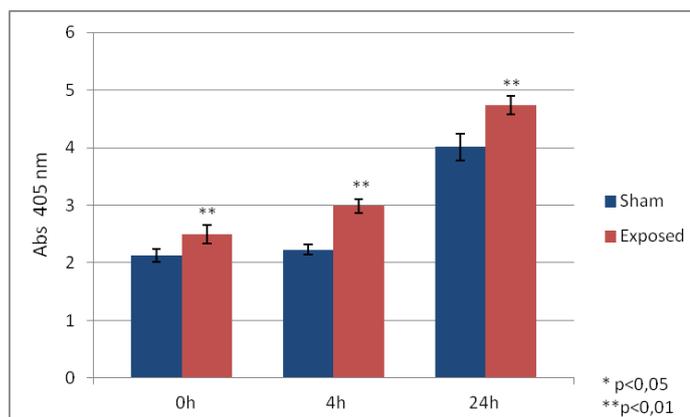


Figura 2. Livelli di attività di ALP nelle cellule Saos-2 0, 4 e 24 ore dopo l'esposizione al campo magnetico.

In uno studio precedente condotto nel nostro laboratorio, era stata già evidenziata la capacità del segnale fisico generato da un secondo dispositivo IGEA di incrementare in maniera significativa l'attività di ALP in ben due diverse linee cellulari (Bisceglia B *et al.*, 2011), ancora una volta senza avere effetti sulla vitalità cellulare. Lo strumento allora utilizzato, dal nome commerciale *Osteospine*, è in grado di generare un campo elettrico di intensità molto bassa con frequenza 60 kHz, burst 12.5, duty cycle 50% e tensione picco-picco 24.5 V. Per condurre le analisi sperimentali, ogni volta gli elettrodi dello strumento sono stati opportunamente tagliati e posizionati sulle pareti più ampie di una apposita flask (25 cm²) per colture cellulari riempita con mezzo di coltura, all'interno della quale le cellule sono adese alla parete inferiore.

Con lo stesso dispositivo (*Osteospine*) sono stati valutati anche gli effetti delle esposizioni cellulari sull'espressione genica. L'impiego della tecnologia dei DNA microarray, ha permesso di evidenziare la modulazione dell'espressione di un numero davvero limitato di geni, soprattutto molto tempo dopo l'esposizione (24 ore), lasciando intuire che in realtà, a questo livello, gli effetti del campo elettrico analizzato possano essere per lo più indiretti (Caputo M *et al.*, 2014).

Negli ultimi tempi, sempre in ambito ortopedico e in particolare nell'ambito della chirurgia ortopedica, sta destando particolare interesse, l'impiego di scaffold biocompatibili, ovvero strutture tridimensionali realizzate al fine di sostituire diversi tipi di tessuti danneggiati, tra cui in particolare il tessuto osseo. L'obiettivo, nell'ambito della cosiddetta ingegneria tissutale, sarebbe quello di consentire a cellule viventi, introdotte mediante mirate procedure di coltura *in vitro*, di differenziare, proliferare ed organizzarsi come nel tessuto nativo all'interno di tali strutture, in modo da riprodurre fedelmente l'elemento naturale danneggiato da sostituire. Diversi studi suggerirebbero la capacità di alcuni tipi di stimoli fisici di favorire il processo di integrazione di cellule all'interno di strutture di questo tipo (Groeneveld EH *et al.*, 1999; Yarlagaadda PK *et al.*, 2005; Fassina L *et al.*, 2006).

È sembrato, dunque, interessante andare a valutare l'effetto del campo magnetico generato dal nostro apparato (PEMF *Power Supply*) su tale processo di

integrazione, utilizzando scaffold in collagene sintetizzati allo scopo di mimare le caratteristiche biochimiche e strutturali del tessuto osseo.

Per condurre questi tipi di indagini, è stato in primo luogo necessario mettere a punto una procedura di coltura della nostra linea cellulare all'interno degli scaffold *in vitro*. Analisi SEM (ovvero mediante microscopia elettronica a scansione) e di proliferazione cellulare (valutata mediante il saggio MTT), hanno permesso di evidenziare come i protocolli di coltura da noi elaborati siano in grado di consentire l'adesione e la crescita delle SaoS-2, non solo sulla superficie ma anche all'interno dello scaffold.

La messa a punto di queste procedure ha permesso in seguito di valutare l'effetto indotto dallo stimolo elettromagnetico sia sulla vitalità (con saggi MTT) sia sull'attività di ALP (con saggi p-NPP) delle SaoS-2 coltivate all'interno degli scaffold. Anche in questo caso è risultato evidente un incremento significativo di tale attività enzimatica soprattutto dopo 4 e 24 ore di trattamento (Fig. 3), senza alcun effetto sulla vitalità cellulare (dato non mostrato). Confrontando tali risultati con quelli ottenuti con le cellule tal quali (non coltivate nello scaffold), sembrerebbe che l'effetto stimolatorio sull'attività della fosfatasi alcalina da parte del campo elettromagnetico esaminato sia addirittura maggiore in presenza dello scaffold.

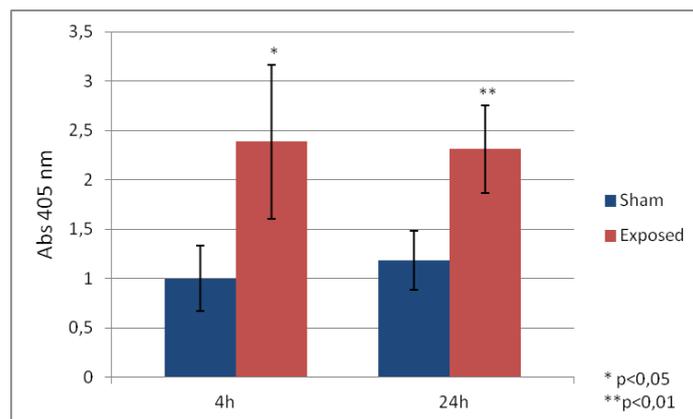


Figura 3. Livelli di attività di ALP nelle cellule SaoS-2 coltivate in scaffold ossei 0, 4 e 24 ore dopo l'esposizione al campo magnetico.

Seppure i dati riportati sono ancora piuttosto preliminari, la stimolazione dell'attività della fosfatasi alcalina, ottenuta in seguito ai trattamenti con entrambi i dispositivi, sia in presenza che in assenza di scaffold tridimensionali, suggerisce un potenziale meccanismo molecolare alla base dell'effetto benefico dei loro specifici segnali, e forse in generale di tutti gli stimoli elettromagnetici, sull'evoluzione di fratture o patologie ossee e sui processi di integrazione scaffold-cellule.

Bisceglia B, Zirpoli H, Caputo M, Chiadini F, Scaglione A, Tecce MF. **2011**. Induction of alkaline phosphatase activity by exposure of human cell lines to a low-frequency electric field from apparatuses used in clinical therapies. *Bioelectromagnetics*; **32(2)**:113-9.

Caputo M, Zirpoli H, De Rosa MC, Rescigno T, Chiadini F, Scaglione A, Stellato C, Giurato G, Weisz A, Tecce MF, Bisceglia B. **2014**. Effect of low frequency (LF) electric fields on gene expression of a bone human cell line. *Electromagn Biol Med*; **33(4)**:289-95.

Fassina L, Visai L, Benazzo F., Benedetti L, Calligaro A, De Angelis MG, Farina A, Maliardi V and Magenes G. **2006**. Effects of electromagnetic stimulation on calcified matrix production by SAOS-2 cells over a polyurethane porous scaffold. *Tissue Eng*; **12(7)**:1985-99.

Groeneveld EH, van den Bergh JP, Holzmann P, ten Bruggenkate CM, Tuinzing DB and Burger EH. **1999**. Mineralization processes in demineralized bone matrix grafts in human maxillary sinus floor elevations. *J Biomed Mater Res*; **48(4)**:393-402.

Jansen JH, Van Der Jagt OP, Punt BJ, Verhaar JA, Van Leeuwen JP, Weinans H and Jahr H. **2010**. Stimulation of osteogenic differentiation in human osteoprogenitor cells by pulsed electromagnetic fields: an in vitro study," *BMC Musculoskeletal Disorders*; **11**:188-99.

Luo F, Hou T, Zhang Z, Xie Z, Wu X and Xu J. **2012**. Effects of Pulsed Electromagnetic Field on the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Orthopedics*; **35(4)**:526-21.

De Mattei M, Caruso A, Traina GC, Pezzetti F, Baroni T and Sollazzo V. **1999**. Correlation between pulsed electromagnetic fields exposure time and cell proliferation increase in human osteosarcoma cell lines and human normal osteoblast cells in vitro. *Bioelectromagnetics*; **20(3)**:177-82.

Martino CF, Belchenko D, Ferguson V, Nielsen-Preiss S, Qi HJ. **2008**. The effects of pulsed electromagnetic fields on the cellular activity of SaOS-2 cells. *Bioelectromagnetics*; **29**:125-32.

Moss DW. **1982**. Alkaline phosphatase isoenzymes. *Clin Chem*; **28**:2007-16.

Rodan SB, Imai Y, Thiede MA, Wesolowski G, Thompson D, Bar-Shavit Z, Shull S, Mann K, Rodan GA. **1987**. Characterization of a human osteosarcoma cell line (Saos-2) with osteoblastic properties. *Cancer Res*; **47(18)**:4961-6.

Saino E, Fassina L, Van Vlierberghe S, Avanzini MA, Dubruel P, Magenes G, Visai L and Benazzo F. **2011**. Effects of electromagnetic stimulation on osteogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells seeded onto gelatin cryogel. *Int J Immunopathol Pharmacol*; **24(1)**:1-6.

Bibliografia - Sezione speciale

Selvamurugan N, Kwok S, Vasilov A, Jefcoat SC and Partridge NC. **2007**. Effects of BMP-2 and pulsed electromagnetic field (PEMF) on rat primary osteoblastic cell proliferation and gene expression. *J Orthop Res*; **25(9)**:1213-20.

Tsai MT, Li WJ, Tuan RS and Chang WH. **2009**. Modulation of osteogenesis in human mesenchymal stem cells by specific Pulsed Electromagnetic Field Stimulation. *J Orthop Res*; **27(9)**:1169-74.

Yarlagadda PK, Chandrasekharan M and Shyan JY. **2005**. Recent advances and current developments in tissue scaffolding. *Biomed Mater Eng*; **15(3)**:159-77.