



Unione Europea



Università degli studi di Salerno

Dottorato di ricerca in
Biochimica e patologia dell'azione dei farmaci
VIII ciclo nuova serie
2006-2010

Effetto selettivo di sieri umani dislipidemicici e degli acidi grassi poliinsaturati sull'espressione genica

Dottoranda

Dr.ssa Hylde Zirpoli

Tutor

Ch.mo Prof. Mario Felice Tecce

Coordinatore

Ch.ma Prof. Antonietta Leone

INDICE

ABSTRACT	Pag 1
RIASSUNTO	Pag 2
Capitolo 1 INTRODUZIONE	Pag 3
Capitolo 2 ACIDI GRASSI	Pag 5
2.1 Definizione e Nomenclatura	Pag 5
2.2 Gli Acidi Grassi Saturi e Monoinsaturi	Pag 6
2.2.1 Aspetti Funzionali: proprietà ed effetti biologici	Pag 7
2.3 Gli Acidi Grassi <i>trans</i>	Pag 8
2.3.1 Aspetti Funzionali: proprietà ed effetti biologici	Pag 9
2.4 Gli Acidi Grassi n-3 e n-6	Pag 11
2.4.1 Aspetti Metabolici	Pag 12
2.4.2 Aspetti Funzionali: proprietà ed effetti biologici	Pag 14
Capitolo 3 ACIDI GRASSI E RAGOLAZIONE GENICA	Pag 19
3.1 I Lipidi Fisiologici	Pag 19
3.1.1 SREBP	Pag 21
3.1.2 SCD	Pag 26
3.1.3 UGT1A1	Pag 28
3.1.4 UCP 2	Pag 31
Capitolo 4 COLESTEROLEMIA	Pag 34
4.1 Omeostasi del Colesterolo	Pag 34
4.2 Ipercolesterolemia	Pag 36
4.3 Classificazione dell'Ipercolesterolemia	Pag 38
Capitolo 5 OBIETTIVI DEL PROGETTO	Pag 40
5.1 Acidi Grassi e Colesterolo	Pag 40

Capitolo 6	Pag 41
MATERILAI E METODI	
6.1 Linea Cellulare e Mezzo di Coltura	Pag 41
6.1.1 Crescita della linea cellulare eucaristica	Pag 41
6.1.2 Propagazione della linea cellulare in coltura	Pag 41
6.1.3 Congelamento cellule	Pag 42
6.2 Selezione dei sieri	Pag 42
6.3 Dosaggio degli Acidi Grassi	Pag 42
6.4 Somministrazione dei sieri umani <i>in vitro</i>	Pag 43
6.5 Estrazione RNA totale e Retrotrascrizione	Pag 43
6.6 Real Time – PCR (Polymerase Chain Reaction)	Pag 44
6.6.1 Analisi di Geni Target	Pag 44
6.7 Analisi statistiche	Pag 45
Capitolo 7	Pag 46
RISULTATI E DISCUSSIONE	
7.1 Selezione sieri in base ai parametri biomorali	Pag 46
7.2 Profilo lipidico	Pag 48
7.3 Modulazione genica	Pag 54
Capitolo 8	Pag 59
CONCLUSIONI	
Bibliografia	Pag 61
Sezione Speciale	
Effetto cardioprotettivo <i>in acuto</i> degli acidi grassi poliinsaturi n-3	Pag 80
Ringraziamenti	Pag 99

Serum profile, in physiological or pathological conditions, results from the whole effect of both nutritional intake and endogenous metabolism and is commonly used as diagnostic tool. Moreover individual serum components and their concentration are often related to specificity, development and progression of many metabolic diseases.

Dietary fat intake strictly affects serum lipid profile and cardiovascular disease epidemiology.

Fatty acids derived from diet, both saturated and polyunsaturated fatty acids, have specific and controversial effects. The underlying molecular mechanisms are numerous but partially understood, and they are related to homeostatic metabolic pathways as well gene expression effects.

Consequently the aim of this project was to assess the ability of serum samples differing in content of nutritionally related lipid components to specifically affect gene expression of human hepatoma cells (HepG2).

We collected 40 human sera, differing in metabolic and nutritionally relevant fatty acids, and tested their effect on hepatoma cells comparing samples from hyperlipidemic (cholesterol average 273 mg/dl) vs normolipidemic male subjects (cholesterol average 155 mg/dl). Analyzed genes were selected among those previously found modulated by lipid nutrients.

Determination of fatty acids in sera showed that arachidonic acid (AA) was 88% more abundant in hypercholesterolemic subjects ($p < 0.01$), while docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentanoic acid (EPA), as quota of total detected fatty acids, were significantly higher in normocholesterolemic subjects by 25% ($p < 0.05$) and by 80% ($p < 0.01$) respectively. Normocholesterolemic subjects had an higher n-3/n-6 fatty acids ratio ($p < 0.05$).

Hypercholesterolemic sera decreased sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c) mRNA by 40% ($p < 0.05$). In hypercholesterolemic group, UDP-glucuronosyltransferase-1A1 (UGT1A1) mRNA expression was significantly increased by 84% ($p < 0.01$). Samples with higher concentrations of DHA, EPA and AA produced a higher expression of UGT1A1 mRNA.

The amount of fatty acids, as c18:2, c18:3, DHA, EPA, AA, is more high in hypercholesterolemic subjects ($p < 0.01$) and has an opposite trend compared to SREBP-1c mRNA expression ($p < 0.05$).

Our data clearly indicate that serum lipid profile is functionally linked with gene expression involved in metabolic and nutritional related conditions.

Sia l'apporto nutrizionale che il metabolismo endogeno contribuiscono in modo diretto e rilevante sulla composizione sierica, utilizzata comunemente come importante strumento diagnostico. Infatti la concentrazione di ciascun suo componente può incidere in maniera specifica sia sullo sviluppo che sulla progressione di differenti malattie metaboliche, in particolare a livello cardiovascolare.

L'obiettivo del nostro progetto è stato quello di individuare dei biomarkers di riferimento clinico, innanzitutto modulabili dallo stato nutrizionale di un individuo e quindi con azione preventiva o diagnostica verso le patologie legate alla dieta. A tale scopo abbiamo testato la somministrazione diretta *in vitro* di differenti sieri umani, opportunamente selezionati, in un sistema sperimentale di cellule di epatoma umano, e valutato l'effetto indotto sulla modulazione di geni connessi al metabolismo lipidico, quali sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c), stearoyl CoA desaturase (SCD), uncoupling protein 2 (UCP2) e UDP-glucuronosyltransferase-1A1 (UGT1A1).

Mediante tecnica gas-cromatografica, un totale di 40 sieri umani, appartenenti a soggetti sani, sono stati caratterizzati per profilo in acidi grassi, sia i principali derivati dalla dieta che quelli metabolicamente sintetizzati e tali sieri sono stati classificati inoltre in due differenti gruppi: normolcolesterolemico (media 155 mg/dl) vs quello ipercolesterolemico (media 273 mg/dl).

In prima analisi, i livelli di acido arachidonico (AA), del suo precursore, l'acido linoleico e di C18:1*trans* risultano significativamente più elevati nel gruppo ipercolesterolemico ($p < 0.01$).

Inoltre i livelli di acido docosaesaenoico (DHA) come percentuale dei poliinsaturi dosati (c18:2, c18:3, DHA, EPA, AA, C18:1*trans*) sono maggiori nei soggetti normocolesterolemici ($p < 0.05$); anche per l'acido ecosopentaenoico (EPA) si riscontra lo stesso *trend* ma con una più alta significatività ($p < 0.01$).

I risultati ottenuti dall'analisi dell'espressione genica mostrano che il livello di messaggero di SREBP-1c ha un'espressione inversa rispetto ai valori di colesterolo ($p < 0.05$).

L'espressione genica di UGT1A1 è indotta in maniera significativa nel gruppo ipercolesterolemico ($p < 0.01$).

La somma dei principali acidi grassi polinsaturi (EPA-DHA-AA) è più elevata in soggetti ipercolesterolemici ($p < 0.01$) e coincide con il *trend* crescente dell'espressione genica di UGT1A1 rispetto ai valori di colesterolo.

La somma degli acidi grassi polinsaturi, quali c18:2, c18:3, DHA, EPA, AA, è più elevata in soggetti ipercolesterolemici ($p < 0.01$) e ha un andamento inverso rispetto ai livelli di espressione genica di SREBP-1c ($p < 0.05$).

Per quel che riguarda la modulazione genica di SCD e UCP2, non ci sono state variazioni di espressione correlabili al quadro lipidemico dei sieri selezionati.

In conclusione i nostri dati mostrano chiaramente che il profilo sierico in acidi grassi e la colesterolemia sono entrambi fattori in grado di indurre un effetto funzionale sull'espressione genica, agendo in maniera specifica e selettiva sul metabolismo lipidico.

CAPITOLO 1

Introduzione

La relazione tra nutrizione e stato di salute è attualmente oggetto di studio della letteratura scientifica e abbraccia sia aspetti epidemiologici, che clinici e molecolari.

Individuare connessioni significative tra dieta e patologie degenerative e di conseguenza correggere in maniera mirata e specifica le abitudini alimentari rappresentano quindi potenziali strumenti preventivi ma al tempo stesso diagnostici.

La genetica e la genomica, applicate al campo nutrizionale, hanno inoltre un ruolo essenziale sia nell'identificare molecole quali markers di predisposizione alle patologie che nell'approfondire gli effetti generali della dieta e dei singoli nutrienti in ciascun individuo.

Il maggiore interesse scientifico nell'ambito nutrizionale è incentrato sui grassi di origine alimentare e in particolare sulle loro implicazioni nell'epidemiologia delle malattie cardiovascolari (Angerer P *et al.* 2000). Ponendo in relazione causale la quota lipidica nella dieta ed il rischio di malattia, le raccomandazioni nutrizionali sono ovviamente direzionate a ridurre la quantità dell'apporto in lipidi, ma ancora più efficace è agire sulla qualità di questi nutrienti.

I lipidi rappresentano infatti una classe eterogenea dal punto di vista chimico, per le loro differenti fonti alimentari o metaboliche e per i loro effetti biologici. I grassi alimentari non hanno tutti la stessa incidenza sul rischio di malattie e le direttive nutrizionali correnti suggeriscono un consumo di grassi saturi al di sotto del 10% dell'apporto energetico giornaliero, meno di 300 mg al giorno di colesterolo e di mantenere l'apporto in acidi grassi *trans* il più basso possibile. Inoltre viene consigliato di limitare i grassi di origine animale, preferendo quelli di origine vegetale, quali ad esempio quelli contenenti l'acido linoleico e l'acido alpha-linolenico, precursori dei ben noti grassi poliinsaturi della serie n-3 e n-6 (U.S. Department of Health and Human Service and U.S. Department of Agriculture. Dietary guidelines for Americans, 2005. Washington, DC: Government Printing Office; 2005).

In ambito epidemiologico, due importanti studi, quali GISSI e DART (Marchiolia R *et al.* 2007; Burr ML *et al.* 1989) hanno mostrato in pazienti colpiti da infarto l'efficacia sia di una terapia che di una dieta ricca in acidi grassi poliinsaturi n-3 e vitamina E nel ridurre la mortalità o l'incidenza di episodi recidivanti di infarto.

Di contro è stata ben descritta una correlazione proporzionale tra assunzione di acidi grassi n-6 o *trans* e rischio di malattie cardiovascolari (Erkkilä A, *et al.* 2008).

Inoltre numerosi studi sono indirizzati ad approfondire gli effetti molecolari di questi grassi alimentari, fino'ora solo parzialmente definiti, e soprattutto focalizzano l'interesse sui meccanismi di regolazione genica di tali nutrienti.

Mettendo in relazione questi diversi fattori, è ipotizzabile che la composizione sierica e più in particolare la sua quota lipidica, maggiormente

soggetta a modulazioni nutrizionali, possa esercitare un'azione diretta sull'espressione genica sia in condizioni fisiologiche che patologiche.

Sottolineando nuovamente che la composizione in acidi grassi del siero umano è in parte legata alla qualità della dieta, il presente studio di ricerca ha indagato l'effetto di sieri umani, selezionati per diverso profilo lipidico e somministrati in un sistema sperimentale *in vitro* di cellule di epatoma umano, sui meccanismi genici potenzialmente implicati nello sviluppo e nella progressione di malattie dislipidemiche.

Attraverso l'analisi dei precedenti dati del nostro laboratorio (Eletto D *et al.* 2005, Caputo M *et al.* 2008) e lo studio della letteratura scientifica sui temi in discussione, è stato possibile selezionare quattro differenti geni. La nostra scelta si è soffermata sullo studio di due importanti fattori implicati nella sintesi degli acidi grassi, ovvero la Sterol Regulatory Element Binding Protein 1 (SREBP-1), in particolare l'isoforma "1c" e la Stearoyl-CoA Desaturase (SCD) (Sampath H *et al.* 2006; Nohturfft A *et al.* 1999). Abbiamo inoltre selezionato UDP-glucuronosiltransferasi 1A1 (UGT1A1) enzima coinvolto nel processo di detossificazione di numerose sostanze quali la bilirubina, farmaci ed altri xenobiotici, determinandone la coniugazione con acido glucuronico e la successiva escrezione (Owens IS *et al.* 2005), e infine Uncoupling Protein 2 (UCP2), proteina disaccoppiante della fosforilazione ossidativa e coinvolta nell'ossidazione degli acidi grassi (Thompson MP *et al.* 2004; Mattiason G *et al.* 2006).

SREBP-1c, SCD, UGT1A1 e UCP2 sono inoltre tutti geni regolati da comuni recettori nucleari eterodimerici, quali peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), liver X receptor (LXR) e retinol X receptor (RXR) (Ide T *et al.* 2003).

Come riportato in letteratura, poiché SREBP-1c, SCD, UGT1A1 e UCP2 sono modulati da nutrienti quali gli acidi grassi poliinsaturi (PUFA), è anche ipotizzabile che i campioni di siero, selezionati per diverso profilo lipidico, possano esercitare una differente modulazione di questi geni quando direttamente aggiunti in coltura in cellule di epatoma umano.

Infine, considerando che la concentrazione ematica di colesterolo è comunemente un parametro correlabile alle abitudini alimentari, abbiamo selezionato due gruppi di sieri con una concentrazione di questo steroide differente, normocolesterolemici vs ipercolesterolemici, per rappresentare e sottolineare il confronto tra uno stile alimentare corretto e uno non salubre.

CAPITOLO 2

Gli Acidi Grassi

2.1 DEFINIZIONE E NOMENCLATURA

Gli acidi grassi (AG) hanno quattro ruoli fisiologici principali: componenti di base di molecole anfipatiche, quali glicolipidi e fosfolipidi, nelle membrane biologiche; riserva energetica sotto forma di triacilgliceroli, esteri neutri del glicerolo; responsabili del trasporto e della localizzazione di membrana di specifiche proteine; alcuni derivati fungono da ormoni e messaggeri di segnale.

Gli AG si trovano in natura quasi esclusivamente legati in forma di estere al gruppo ossidrilico di un alcool, in genere il glicerolo (glicerolipidi), o al gruppo ossidrilico del colesterolo (esteri del colesterolo) e più raramente con legame carbamidico ad un amino gruppo di un amino alcool (es. sfingosina). Nei sistemi biologici solo una piccola frazione di AG è presente in forma non legata (AG liberi, AGL), ma comunque complessata a proteine specializzate, quali l'albumina plasmatica.

Il nome sistematico di un acido grasso si forma dal nome dell'idrocarburo da cui deriva sostituendo la $-o$ finale con la desinenza $-oico$.

Gli atomi di carbonio degli acidi grassi sono numerati a partire dal carbonio contenente il gruppo carbossilico. Gli atomi di carbonio 2 e 3 sono spesso indicati rispettivamente come α e β . L'atomo di carbonio metilico all'estremità distale della catena è chiamato anche carbonio ω o n . La posizione di un doppio legame è indicata dal simbolo Δ seguito dal numero esponente relativo. In alternativa, la posizione di un doppio legame può essere indicata contando a partire dall'estremità distale e considerando l'atomo di carbonio ω o n (carbonio metilico) come numero 1 (Stryer L, 1996).

Gli acidi grassi sono costituiti da una catena carboniosa, in genere a numero pari di atomi di carbonio, di solito compresa tra 12 e 24 atomi di carbonio, i più comuni sono quelli a 16 e 18 atomi (Fig. 1).

Gli acidi grassi vengono normalmente indicati con la lettera C (che sta per carbonio) seguita da un numero, che corrisponde al numero di atomi di carbonio contenuti nella catena; seguono poi i due punti ed un secondo numero, che corrisponde al numero di doppi legami contenuti nell'acido grasso.

Le proprietà degli acidi grassi sono strettamente dipendenti dalla lunghezza della loro catena e dal numero di doppi legami; in relazione a queste caratteristiche si distinguono tre classi di AG (Fig. 1):

- Gli acidi grassi saturi (**AGS**), in cui non sono presenti doppi legami;
- Gli acidi grassi monoinsaturi (**AGM** monoinsaturi o **MUFA**, *Mono-Unsaturated Fatty Acids*), con un unico doppio legame;
- Gli acidi grassi poliinsaturi (**AGP** polinsaturi o **PUFA**, *Poly-Unsaturated Fatty Acids*), in cui ci sono più doppi legami.

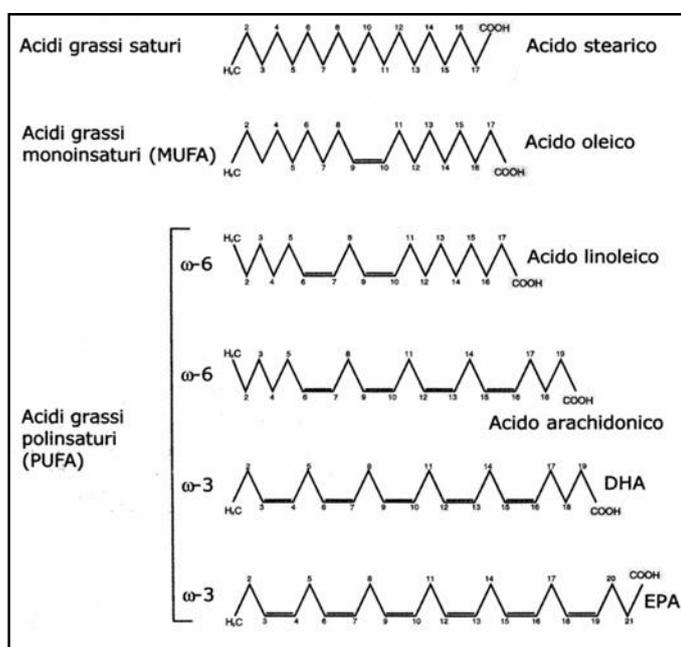


Figura 1. Classificazione degli acidi grassi saturi , mono- e poliinsaturi.

Mentre gli AGS e AGM possono venire sintetizzati *de novo* negli organismi superiori, quelli a due o più doppi legami non possono essere biosintetizzati in quantità adeguate nell'uomo, ed essendo indispensabili sia per le funzioni cellulari di base che in generale per la crescita e lo sviluppo dell' organismo, sono definiti Acidi Grassi Essenziali (AGE o EFA).

2.2 GLI ACIDI GRASSI SATURI E MONOINSATURI

Gli AGS sono costituiti da una catena carboniosa con legami singoli C-C.

In natura esistono numerose forme di AGS che differiscono tra loro per il numero di atomi di carbonio, partendo da tre atomi (propionico) fino all'esatriacontanoico che possiede invece una catena di 36 atomi di carbonio.

Di solito i grassi saturi sono di origine animale, presenti in prodotti caseari o ad esempio in carni rosse, sebbene alcuni tipi sono di natura vegetale, come quelli presenti nell'olio di cocco, di semi di cotone o di palma.

Gli acidi grassi saturi possono derivare dalla dieta o essere di origine endogena, sintetizzati per aggiunta di unità di malonil-CoA a partire da una molecola di acetil-CoA; sono, quindi, nutrienti non essenziali.

I MUFA invece sono lipidi caratterizzati dalla presenza di un unico doppio legame nella catena carboniosa.

I principali grassi monoinsaturi e non essenziali sono:

- L'acido palmitoleico (C16:1 n-7);
- L'acido oleico (C18:1 n-9);

che derivano rispettivamente dall'acido stearico e dall'acido palmitico dalla biosintesi regolata dall'enzima Δ -9-desaturasi.

Un alimento particolarmente ricco di acido oleico è l'olio di oliva con percentuali variabili dal 60 all'80%. È anche presente nelle mandorle, nelle nocciole, nelle arachidi, nei pistacchi e rispettivi oli.

L'acido palmitoleico si trova in particolare nell'olio di Macadamia e in quello di Olivello Spinoso.

2.2.1 ASPETTI FUNZIONALI: PROPRIETÀ ED EFFETTI BIOLOGICI

Numerosi studi epidemiologici e trials clinici hanno ampiamente dimostrato il rapporto diretto tra il consumo di acidi grassi saturi nella dieta e il rischio di malattie cardiovascolari (Davton S *et al* 1968).

L'effetto degli AGS derivanti dalla dieta è essenzialmente dovuto all'aumento dei livelli ematici di colesterolo associato a lipoproteine a bassa densità (LDL) (Mensink RP *et al* 1992). Per ottenere un effetto sia preventivo che clinico in ambito di malattie cardiovascolari, è necessario non solo ridurre la quota di questi acidi grassi nella dieta, ma sostituirla con quella in acidi grassi poliinsaturi. Infatti il rapporto LDL/HDL è favorevolmente influenzato più dalla sostituzione degli AGS con AGP, che dalla sola riduzione della quota di AGS (Hodson L *et al*. 2001).

La composizione e le dimensioni delle lipoproteine LDL e HDL possono dipendere da differenti processi metabolici e le LDL più piccole e più dense sono quelle più fortemente associate con il rischio di malattie cardiovascolari (Berneis KK *et al* 2002). Si è visto che un elevato *intake* di grassi saturi, come miristico e palmitico, è associato ad un aumento di concentrazione delle particelle più piccole di LDL (Dreon DM *et al* 1998).

È ulteriormente importante sottolineare l'eterogeneità dei grassi saturi e il loro effetto sui fattori di rischio. Per esempio, l'acido stearico non è un agente ipercolesterolemico (Hunter JE *et al* 2010) mentre l'acido miristico ha un'azione ipercolesterolemizzante (Nicolosi RJ *et al*. 1997).

I saturi hanno inoltre un effetto trombogenico, in particolare lo stearico, interferendo con l'aggregazione piastrinica (Tholstrup T *et al* 2005).

L'azione degli acidi grassi saturi sull'espressione genica e in particolare quella epatica è ancora non del tutto chiarita. È stato visto che diete ricche in colesterolo e AGS, con una catena tra 12 e 16 atomi di carbonio, possono ridurre l'espressione epatica del recettore per le LDL (Fernandez ML, *et al* 2005).

Sono stati dosati i livelli plasmatici dei trigliceridi postprandiali in soggetti sottoposti per otto settimane a due differenti tipi di dieta, una ricca

in grassi monoinsaturi e povera di saturi, l'altra invece in percentuali opposte degli acidi grassi in esame. Si è osservato che il ripristino dei livelli basali di trigliceridi avviene più velocemente nei soggetti alimentati con la dieta più ricca in MUFA (Roche HM *et al* 1998).

I MUFA sono responsabili della riduzione dei livelli di colesterolo plasmatico totale e associato ad LDL, mentre aumentano i livelli del colesterolo HDL in soggetti normolipidemicici e su modelli murini di aterosclerosi (Grundey SM *et al* 1990).

La sostituzione isoenergetica nella dieta dei grassi saturi con i monoinsaturi porta alla riduzione dell'attività dell'enzima colesteril-ester transferasi (CEPT), che favorisce il trasferimento degli esteri di colesterolo dalle HDL alle lipoproteine contenenti l'apolipoproteina B (apoB), comprese le LDL. Questo enzima è uno dei target farmacologici nella terapia ipocolesterolemizzante (Jansen S *et al* 2000).

I MUFA riducono la suscettibilità delle LDL all'ossidazione (Aviram M *et al* 1993), migliorano la funzionalità endoteliale ed hanno un modesto effetto ipotensivo dovuto all'effetto di vasodilatazione per rilascio di monossido nitrico (NO); inducono inoltre la formazione e l'adesione dei monociti ed una riduzione dei livelli di *markers* dell'infiammazione e dell'aggregazione piastrinica (De la Cruz *et al* 2000; Oubina P *et al* 2001).

L'acido erucico, al contrario dell'oleico, però fa parte degli acidi grassi monoinsaturi "indesiderabili". Se consumato ad elevate quantità (la legge impone che gli oli alimentari e le margarine lo contengano in misura inferiore al 5%) ha ripercussioni negative sulla crescita, sul fegato e sul cuore (Badawy IH *et al* 1994).

Anche l'acido grasso monoinsaturo palmitoleico non ha effetti benefici, in quanto tende ad aumentare il colesterolo-LDL diminuendo quello HDL (Adams TH *et al* 2010).

2.3 ACIDI GRASSI TRANS

Il passaggio da acidi grassi saturi a molecole progressivamente più insature costituisce un elemento strutturale di primaria importanza funzionale. In natura, i doppi legami presenti negli AG poliinsaturi sono generalmente presenti in posizione *cis*, ossia le due porzioni della molecola prima e dopo il doppio legame sono poste dallo stesso lato, rispetto ad un piano ideale su cui è collocato il doppio legame.

Gli AG in cui i doppi legami hanno configurazione sterica di tipo *trans* si trovano in natura in quantità apprezzabili nel latte bovino e dei mammiferi ruminanti.

Ma gli AG *trans* vengono prodotti in quantità molto più rilevanti per trasformazione industriale di oli vegetali, nella produzione di margarine e in prodotti da forno.

Una recente comunicazione dell'*American Heart Association* suggerisce che l'apporto totale di *trans* deve essere inferiore all'1% dell'apporto calorico totale (Lichtenstein AH *et al* 2006).

2.3.1 ASPETTI FUNZIONALI: PROPRIETÀ ED EFFETTI BIOLOGICI

L'attenzione a questi acidi grassi e agli alimenti che li contengono, si basa principalmente sull'incidenza negativa che essi hanno sul rischio di malattie cardiovascolari.

Un gruppo di ricerca norvegese (Mensink RP *et al* 1990) ha paragonato due differenti diete isocaloriche ma differenti per grassi contenuti, *trans* vs MUFA, e valutato gli effetti sul profilo lipidico ematico di 59 volontari sani. Rispetto ai MUFA, una dieta ricca in acidi grassi *trans* aumenta il colesterolo LDL mentre diminuisce la frazione HDL.

Il consumo di acidi grassi *trans* aumenta significativamente il rapporto colesterolo totale/HDL e la apoproteina B. Questi acidi grassi inducono un aumento dei livelli basali plasmatici dei trigliceridi e riducono la dimensione delle particelle LDL in maniera dose-dipendente. La lipoproteina a [Lp(a)], che consiste in una frazione di LDL arricchita da glicoproteine, è un marker associato all'aumento del rischio cardiovascolare (Lichtenstein AH *et al* 2000). È stato osservato in 6 differenti studi di popolazione che questi grassi aumentano i livelli di Lp(a), se inoltre paragonati all'effetto di altri tipi di acidi grassi su questo *marker*. Anche l'aumento di CEPT indotto dai *trans* contribuisce all'aumento delle LDL e alla riduzione delle HDL (Gatto LM *et al* 2003).

Alcuni dati di letteratura affermano che gli acidi grassi *trans* sono in grado di acutizzare l'insulino-resistenza in soggetti obesi e diabetici, effetto che però si riduce nei soggetti sani giovani (Kavanagh K *et al* 2007; Risérus U *et al* 2004).

Una dieta in alto contenuto di *trans* aumenta il grasso viscerale, il contenuto in lipidi epatici e compromette la tolleranza al glucosio e la sensibilità all'insulina (Risérus U *et al* 2004).

In uno studio condotto su pazienti ipercolesterolemici, dopo un mese di alimentazione controllata, in cui la quota lipidica era rappresentata dal 6,7% di acidi grassi *trans*, è stato osservato un aumento dei markers di infiammazione quali Interleuchina-6 e la TNF alpha (Han SN *et al* 2002). In un altro studio (Mozaffarian D *et al* 2004), i livelli di proteina reattiva C vengono aumentati da una dieta ricca in *trans*.

Un altro possibile effetto avverso è quello di inibire l'incorporazione degli acidi grassi poliinsaturi nelle membrane cellulari, interferendo anche con la loro elongazione e desaturazione. Recentemente è stato documentato per questi nutrienti anche un effetto pro-aritmico; il motivo di questa azione, opposta a quella degli acidi grassi poliinsaturi n-3, potrebbe risiedere proprio nella variazione della struttura tridimensionale dell'acido grasso associata alla presenza di un doppio legame *trans*. In conformazione *cis* il doppio legame impartisce una "piegatura" alla molecola dell'acido grasso. Una serie di doppi legami *cis* (come nel caso degli n-3) conferisce una struttura in grado di aumentare la fluidità delle membrane. Contrariamente il doppio legame in conformazione *trans* conserva una struttura lineare, molto più facilmente "impacchettabile", in grado così di irrigidire le membrane cellulari (Wallace SK *et al* 2009).

Anche la funzione endoteliale è depressa in soggetti che consumano dosi elevate di acidi grassi della serie *trans*, che in maniera più significativa

rispetto ai grassi saturi inducono la perdita di risposta vasodilatatoria endotelio-mediata (de Roos NM *et al* 2002).

Il rischio di incorrere in eventi cardiovascolari come l'infarto aumenta linearmente al crescere della concentrazione degli acidi grassi *trans* nel sangue.

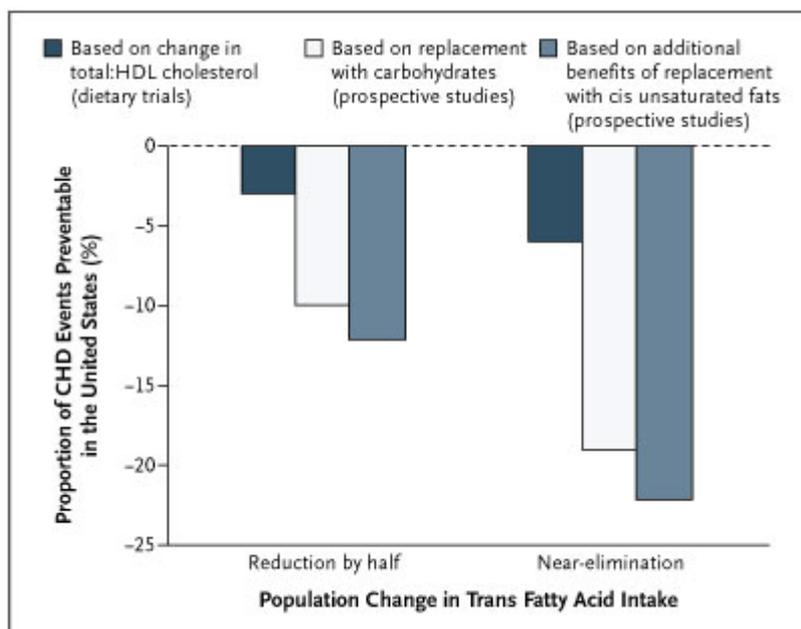


Figura 2. Stima degli effetti sull'incidenza della cardiopatia ischemica (infarto miocardico non fatale e morte coronarica), riducendo i consumi di acidi grassi *trans* di produzione industriale.

Sulla base di questi e di altri dati, il gruppo di ricerca del Prof. Mozaffarian ha recentemente calcolato che un'eliminazione completa degli acidi grassi *trans* dalla dieta, e la successiva sostituzione con carboidrati o acidi grassi insaturi a conformazione *cis*, potrebbe ridurre l'incidenza delle malattie cardiovascolari negli Stati Uniti del 20-25% (Fig. 2).

Gli effetti sfavorevoli degli acidi grassi *trans* assumono particolare importanza nei soggetti con ipercolesterolemia e soprattutto nei pazienti con sindrome metabolica o con sola obesità viscerale. Sia la riduzione della colesterolemia nella frazione HDL che l'azione pro-infiammatoria associate al loro consumo, sono infatti particolarmente negative in pazienti nei quali questi parametri sono già alterati, in modo più o meno marcato, da patologie di base (Mozaffarian D *et al* 2009).

2.4 ACIDI GRASSI n-3 E n-6

Gli acidi grassi essenziali sono suddivisi principalmente in due classi, n-3 ed n-6, a seconda della posizione del primo doppio legame a partire dalla porzione metilica della molecola. Gli acidi grassi capostipiti di questi due gruppi sono l'acido α -linolenico (18:3 n-3; ALA) e l'acido linoleico (18:2 n-6; LNA) entrambi di origine vegetale e forniti con la dieta, per questo detti essenziali. A livello dei microsomi epatici e cerebrali, questi due acidi grassi sono modificati da sistemi enzimatici quali le desaturasi, in grado di inserire un doppio legame nella catena carboniosa, e le elongasi, invece responsabili di aggiunge atomi di carbonio ad un acido grasso allungandone la catena.

Gli acidi grassi n-6 ed n-3 sono componenti fondamentali delle membrane plasmatiche; inoltre, la loro trasformazione metabolica dà origine agli eicosanoidi, che sono importanti mediatori di numerose reazioni cellulari. Prostaglandine, trombossani e leucotrieni derivano tutti dal metabolismo degli acidi grassi n-6 ed n-3 attraverso reazioni catalizzate dagli enzimi ciclossigenasi e lipossigenasi.

Gli acidi grassi n-3 più comuni sono: l'acido α -linolenico o ALA (18:3 n-3), l'acido stearidonico (18:4 n-3), l'acido eicosatetraenoico (20:4 n-3) l'acido eicosapentaenoico o EPA (20:5 n-3), l'acido docosapentaenoico (22:5 n-3), l'acido docosaesaenoico o DHA (22:6 n-3).

Gli acidi grassi della serie n-3 sono normalmente contenuti negli alimenti marini, in alcune piante ed anche in alcuni prodotti animali quali pollo, tacchino ed uova. Alcuni n-3 sono presenti nei vegetali a foglia verde, nei legumi, nella frutta secca, nelle noci, in alcuni oli come quelli di lino e di soia, nell'estratto di colza o ravizzone. L'acido α -linolenico può essere ottenuto nelle piante dalla conversione del linoleico, sintesi che avviene nelle membrane dei cloroplasti e non possibile nel mondo animale. EPA e DHA sono presenti nel fitoplancton e sono concentrati in particolare in alcune specie ittiche (pesci che vivono nelle acque fredde).

EPA e DHA sono i più importanti acidi grassi a lunga catena della serie n-3 e svolgono nell'organismo umano importanti funzioni strutturali e molecolari.

Il DHA ha prevalentemente una funzione strutturale; infatti, è maggiormente presente nei fosfolipidi dei sinaptosomi cerebrali, nella retina e nei fosfolipidi dei canali intramembrana del sodio. Esso ha un ruolo importante nello sviluppo e nella maturazione cerebrale, dell'apparato riproduttivo e del tessuto retinico.

L'EPA è il principale precursore delle prostaglandine della serie 3, le quali posseggono una importante attività antiaggregante piastrinica.

Molti degli effetti positivi associati all'incorporazione degli n-3 nelle membrane biologiche sono da associare all'aumentata fluidità delle medesime: ciò consentirebbe alle proteine di membrana con funzione di *carrier* di attraversare più agevolmente nel doppio strato, ruotando con meccanismo a ping-pong, dal versante citoplasmatico a quello extracellulare con maggiore facilità (Kelly FJ *et al* 2002).

Gli acidi grassi più importanti della serie n-6 sono l'acido linoleico (18:2 n-6), l'acido γ -linolenico o LNA (18:3 n-6), l'acido diomo- γ -linolenico (20:3 n-6), l'acido arachidonico o AA (20:4 n-6). Il più diffuso è l'acido

linoleico che è presente negli oli di semi; l'acido arachidonico è tipico del mondo animale essendo un prodotto di conversione dell'acido linoleico. L'acido γ -linolenico è il primo intermedio nella conversione dell'acido linoleico ad acido arachidonico; l'acido diomo- γ -linolenico ha un rapido turnover metabolico in quanto è rapidamente convertito a prostaglandine della serie 1.

Gli acidi grassi poliinsaturi a lunga catena della serie n-6 hanno, anch'essi, un ruolo strutturale e funzionale. L'acido arachidonico è presente nei fosfolipidi di membrana ed è importante, opportunamente bilanciato con il DHA, nello sviluppo embrionale e nel processo di crescita; produce le prostaglandine della serie 2 (attraverso la via ciclossigenasica) dando luogo alla formazione di intermedi metabolici ad attività pro-infiammatoria e aggregante piastrinica (trombossano A₂). Dall'acido arachidonico tramite la via lipossigenasica si formano i leucotrieni, che hanno una azione bronco costrittrice.

In condizioni alimentari bilanciate, il principale AGP della serie n-6 nel plasma e tessuti è l'AA, mentre per la serie n-3, è il DHA. Il rapporto tra AA e DHA è tuttavia in genere ampiamente a favore del primo nella maggior parte delle cellule, con un rapporto di 5-6/1, mentre livelli apprezzabili di DHA sono presenti a livello del sistema nervoso (rapporto 1-2/1), soprattutto in alcune membrane come le sinapsi. L'EPA è poco presente nei lipidi plasmatici e cellulari (rapporto EPA/DHA 0,1-0,3), e livelli apprezzabili sono presenti solo dopo ingestione di EPA preformato, ad esempio con l'assunzione di pesce o derivati (olio di pesce).

2.4.1 ASPETTI METABOLICI

Come precedentemente menzionato, la conversione degli AG in derivati a maggior numero di atomi di carbonio ed a più elevato grado di insaturazione avviene mediante l'intervento di enzimi specializzati (rispettivamente elongasi e desaturasi) prevalentemente localizzati a livello del sistema reticolo endoplasmatico (microsomi) (Fig. 3). Le elongasi sono sistemi enzimatici che aggiungono due atomi di carbonio (un residuo di acetato) all'AG di partenza, mediante un processo che sostanzialmente riproduce in senso inverso quello della β -ossidazione degli AG. Questi enzimi non sono particolarmente selettivi e la loro attività non è influenzata da fattori esogeni (apporto alimentare di AG, fattori endocrini, farmacologici o tossicologici).

Le desaturasi sono enzimi in grado di inserire doppi legami nella catena carboniosa, conferendo in questo modo specificità e funzione biologica per ciascun AG.

Le desaturasi sono attivate ad esempio dai carboidrati o dall'insulina; inibite invece da condizioni quali il digiuno, da diete ricche in colesterolo, da adrenalina o glucagone e da ormoni steroidei; in particolare per le Δ -6-desaturasi, la loro attività è indotta da diete carenti in AGE e inibita da alti apporti di AGP, quali oli vegetali (ricchi in acido linoleico) o oli marini (ricchi in AGP n-3).

Si conoscono tre principali desaturasi, definite dal simbolo Delta seguito dal numero della posizione del carbonio in cui viene inserito il

doppio legame, le Delta (Δ) 9, 6, 5. L'inserimento di un doppio legame in posizione 4, attribuito inizialmente ad una Δ -4-desaturasi, essenziale per la sintesi dell'ultimo e più rilevante componente della serie n-3, il DHA, avviene invece tramite una serie complessa di reazioni, che coinvolgono una retroconversione (β -ossidazione) di un composto a 6 doppi legami e 24 carboni che è localizzata a livello perossisomiale.

Mentre nel regno vegetale dall'acido oleico avviene la conversione ad acido linoleico (AL) e successivamente ad α -linolenico (ALA) per l'esistenza di enzimi in grado di inserire doppi legami in specifiche posizioni, queste reazioni invece non avvengono in quantità efficiente negli organismi animali, che devono pertanto assumere tali composti tramite l'alimentazione. Dato l'assoluto bisogno di questi AG e soprattutto dei loro derivati a più lunga catena ed altamente insaturi, in particolare l'AA della serie n-6 e l'EPA e il DHA della serie n-3 sono considerati AG **essenziali**.

Un'altra caratteristica fondamentale degli acidi grassi n-6 e n-3 è il fatto che il loro metabolismo segue vie sintetiche distinte, tuttavia, essi sfruttano processi catalizzati dagli stessi enzimi. Pertanto, le due famiglie di acidi grassi poliinsaturi competono per lo stesso sistema di biosintesi. In particolare l' Δ -6-desaturasi rappresenta un enzima cruciale per la sintesi di n-6 ed n-3, convertendo sia l'acido cis-linoleico in acido γ -linolenico, sia l'acido α -linolenico in acido stearidonico (C18:4 n-3).

L'affinità di questa desaturasi per gli AG è differente; infatti la concentrazione di ALA richiesta per inibire la formazione di LNA del 50% è circa 10 volte la concentrazione di AL, suggerendo quindi che in presenza di elevate concentrazioni di AL il pathway biosintetico porta preferenzialmente alla formazione di AA. Inoltre una ridotta quantità di ALA inibisce la formazione di DHA e stimola invece quella dell'acido docosapentaenoico, considerato un indicatore funzionale delle concentrazioni di DHA. I mammiferi possono convertire il DHA nuovamente in EPA; nell'uomo però questo processo è complesso e non efficientemente indotto.

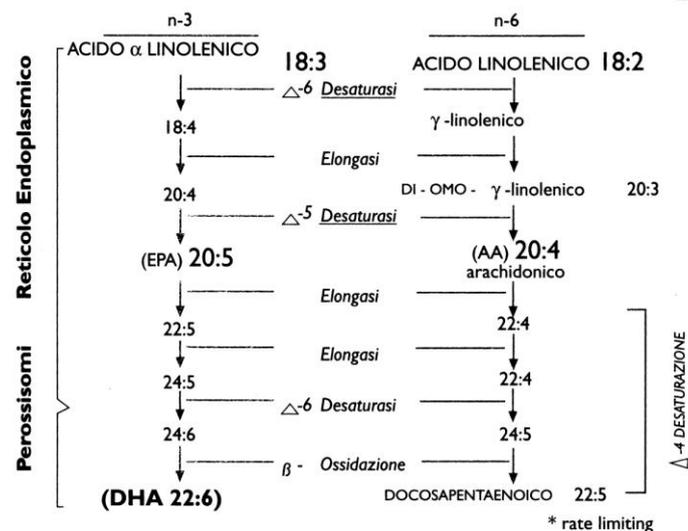


Figura 3. Vie metaboliche nella sintesi di AGP-LC da AGP-CC

2.4.2 ASPETTI FUNZIONALI: PROPRIETÀ ED EFFETTI BIOLOGICI

Un numero elevato di studi condotti sugli AGP, in sistemi *in vitro*, *in vivo* e soprattutto in applicazioni cliniche, ha mostrato che tali composti sono coinvolti in ampi processi metabolici e funzionali oltre che nella modulazione dell'espressione di vari *pathways* genici. L'attenzione si è rivolta al ruolo differenziale, talvolta contrapposto, degli AGP delle due serie metaboliche n-6 e n-3: LNA e AA da un lato e ALA, EPA e DHA dall'altro.

Gli n-6, in particolare l'AA, sono precursori degli eicosanoidi, prodotti sia dalla ciclossigenasi (COX), quali le prostaglandine, il trombossano piastrinico, la prostaciclina vascolare della serie 2, sia prodotti dalla lipossigenasi (LOX), quali i leucotrieni B4 e C4. Tali composti sono coinvolti in processi rilevanti nella fisiopatologia cardiovascolare, ad esempio la tendenza alla trombosi per attivazione piastrinica da parte del trombossano A2, la produzione di leucotrieni della serie 4 (LTB4 e C4) da parte di leucociti, con conseguente attivazione di processi infiammatori e di disfunzioni endoteliali.

Gli n-3 invece sono precursori di quella classe di eicosanoidi con effetti anti-infiammatori e anti-trombotici. Di conseguenza l'accumulo di n-3, soprattutto di EPA, porta ad una ridotta produzione di eicosanoidi della serie 4, derivanti invece dall'AA; ad un aumento nella produzione di eicosanoidi della serie 3 e dalla serie 5 (Fig. 4); e infine interferisce con la sintesi di AA a partire da LNA.

Un'alimentazione ricca in DHA e EPA riduce il rischio di mortalità e recidivanti nell'infarto. È stato dimostrato infatti che gli n-3 hanno numerosi effetti cardioprotettivi: riduzione della trigliceremia; riduzione dell'entità di 5-10 mm/Hg della pressione sanguigna sia sistolica che diastolica; aumento della stabilità delle placche aterosclerotiche; miglioramento della contrattilità cardiaca e dell'elasticità vascolare; effetto anti-aritmico per azione sui canali ionici del calcio di tipo L e del sodio.

È stato documentato che gli AG n-3 sono in grado di ridurre la pressione arteriosa sia in soggetti sani (Lorenz R *et al* 1983, Rogers S *et al* 1987) che in pazienti affetti da ipertensione arteriosa (Bona KH. *et al* 1990).

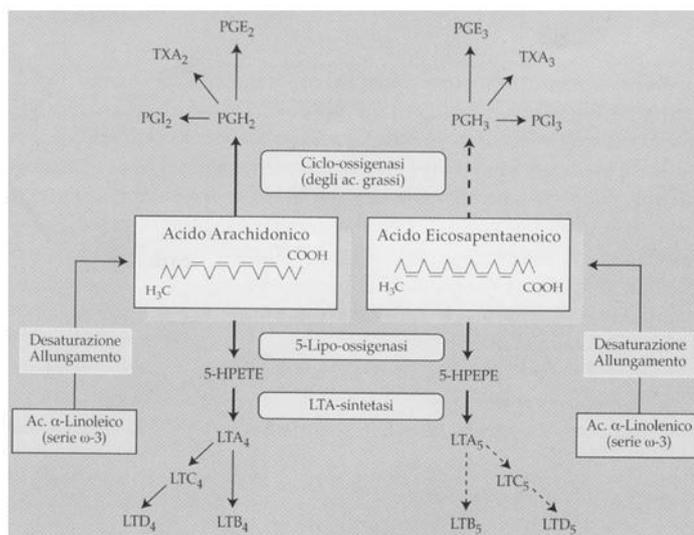


Figura 4. Trasformazione dell'AA (serie n-6) e dell'EPA (serie n-3) in eicosanoidi. Legenda: PGH, PGI, PGE, TXA: prostaglandine e trombossani; 5-HPETE: acido-5-idroperossieicosatetraenoico; 5-HPEPE: acido-5-idroperossieicosapentaenoico; LTA, LTB, LTC, LTD: leucotrieni (serie 4 e 5).

Un adeguato apporto di AG n-3 con la dieta sposta l'equilibrio verso una maggiore incorporazione a livello delle membrane biologiche della quota di questi grassi, e riduce la percentuale di n-6 (Weber PC *et al* 1988), con maggiore metabolizzazione dell'EPA rispetto all'AA.

I prostanoidi derivati dagli n-3 possiedono azione antitrombotica (Rogers S *et al* 1987). Gli AG n-3 sarebbero in grado di garantire questo benefico effetto anche mediante meccanismi aggiuntivi (Sacks FM *et al* 2002) quali il potenziamento della fibrinolisi, riduzione del fibrinogeno e riduzione dell'attività della lipoproteina A, che rappresenta un potente fattore pro-trombotico oltre che pro-aterogeno. Tali effetti peraltro sono ritenuti sovrapponibili a quelli indotti dall'assunzione di aspirina.

La capacità degli n-3 di influenzare alcuni parametri di fluidità e quindi di funzionalità delle membrane cellulari è probabilmente alla base della loro azione anti-aritmica. Gli AG a lunga catena (AG-LC), come gli AG n-3, vengono infatti incorporati nella componente lipidica delle membrane cellulari: a seconda del grado di insaturazione, essi influenzano la fluidità delle membrane, condizionando l'azione di molte proteine di membrana, tra le quali quelle dotate di un ruolo di canale o di *Carrier* specifico.

Gli AG n-3 mediante l'attenuazione dei processi infiammatori possono svolgere un ruolo centrale nella prevenzione del processo aterosclerotico e negli eventi acuti connessi alla rottura delle placche. Negli ultimi anni numerosi studi clinici controllati hanno suggerito che l'attività anti-infiammatoria degli n-3 potrebbe non essere limitata esclusivamente

all'aterosclerosi, ma estendersi anche ad alcuni processi patologici caratterizzati da spiccata componente infiammatoria, in modo particolare l'artrite reumatoide (Nielsen GL *et al* 1991, James MJ *et al* 1997), il morbo di Crohn (Belluzzi A *et al* 1996, Belluzzi A *et al* 2000), la psoriasi (Majser P *et al* 2002) e la dermatite atopica (Soyland E *et al.* 1994).

Gli AG n-3 sono in grado di influenzare l'assetto lipidico. Gli effetti più evidenti e studiati sono quelli che si verificano a carico dei trigliceridi. Mediante diversi studi clinici è stato documentato una cospicua riduzione della trigliceridemia dopo supplementazione con AG polinsaturi n-3 (Feskens EJ *et al* 1993). La riduzione media della trigliceridemia si attesta intorno al 30% e l'effetto ipotrigliceridemizzante indotto da questi AG sembra essere dose-dipendente.

Il meccanismo attraverso cui gli AG n-3 determinano la riduzione della trigliceridemia appare legato alla diminuita sintesi epatica di AG, di trigliceridi e di VLDL (Weber P *et al* 2000, Mori TA *et al* 2001).

Inoltre gli AG n-3 sembrerebbero incrementare il catabolismo delle VLDL in LDL, dal momento che le VLDL ricche in AG n-3 sarebbero più suscettibili all'azione delle lipoprotein-lipasi (Mori TA *et al* 2001).

La dieta ricca in AG n-3 incrementa, seppur in maniera modesta, i livelli delle HDL, in particolare della frazione HDL 2. L'incremento del colesterolo-HDL (HDL-C) si potrebbe spiegare con la riduzione degli AG liberi nel plasma, che causerebbe un ridotto trasferimento degli esteri del colesterolo dalle HDL alle LDL e VLDL (Rustan AC *et al* 1997).

Meno certa è l'azione che potrebbero svolgere sulle concentrazioni plasmatiche delle LDL. È stato descritto da diversi studi un modico incremento delle LDL dopo supplementazione di AG n-3 che però non si manterrebbe nel tempo, infatti nei trials sufficientemente lunghi i livelli di LDL sono gradualmente rientrati ai valori di partenza (Mori TA *et al* 2001).

L'aumento delle concentrazioni delle LDL potrebbe essere dovuto ad un effetto paradossale (da riduzione delle VLDL) oppure ad una maggiore conversione delle VLDL in LDL (Mori TA *et al* 2001, Poli A *et al* 2002). È stato anche ipotizzato che l'incremento dei livelli di LDL sia da ascrivere ad una maggiore dimensione delle singole particelle di LDL piuttosto che ad un loro incremento numerico (Rustan AC *et al* 1997, Suzukawa M *et al* 1995).

Un altro interessante effetto positivo degli AG n-3 sarebbe quello esercitato sulla lipidemia post-pandriale, a cui di recente è stato assegnato un ruolo indipendente nello sviluppo dell'aterosclerosi (Roche HM *et al* 2000). Gli AG n-3 sembrano opporsi all'incremento della lipidemia post-pandriale agendo sulla trigliceridemia post-pandriale non solo in soggetti normali o ipertrigliceridemici ma anche in pazienti affetti da iperlipidemia mista già in trattamento con statine (Nordoy A *et al* 2000).

La presenza dei doppi legami all'interno della molecola degli AG poliinsaturi può in qualche modo favorire la formazione di radicali liberi mediante meccanismi di perossidazione lipidica.

Studi condotti per verificare se gli AG polinsaturi della serie n-3 siano in grado di determinare una maggiore ossidazione dei lipidi sembrano aver smentito l'esistenza di tale rischio: infatti in soggetti che hanno ricevuto supplementazione con AG n-3 non si è verificato alcun aumento misurabile della perossidazione lipidica, registrandosi invece effetti di segno opposto, con riduzione del metabolismo ossidativo (Mori TA *et al* 1999, Mori TA *et al* 2000). Tale risultato ha avuto conferma sperimentale *in vitro*: è stato infatti

evidenziato, da uno studio recente, che in presenza di AG n-3 le LDL mostrano una ridotta suscettibilità all'ossidazione metallo indotta (Ramirez-Tortosa C *et al* 1999).

In soggetti non diabetici, siano essi sani, ipertesi o dislipidemicici, non sono stati messi in evidenza effetti negativi sulla tolleranza ai carboidrati dopo somministrazione di AG n-3 (Mori TA *et al*. 1999, Grundt H *et al* 1995). Nei diabetici, al contrario, la somministrazione degli AG n-3 potrebbe determinare un peggioramento del compenso glico-metabolico (anche se in realtà i dati della letteratura sono contrastanti).

Nei diabetici di tipo 1 gli effetti sul controllo glicemico e sui livelli di emoglobina glicata sono risultati assenti o modesti. Nei diabetici di tipo 2 spesso, ma non invariabilmente, si è registrato un deterioramento di grado moderato del compenso glicemico (Malasanos TH *et al* 1991).

È stata dimostrata una possibile inibizione, da parte degli AG n-3, della secrezione insulinica direttamente a livello delle cellule beta. È stato documentato un incremento della glicemia dopo carico orale o intravenoso di glucosio oppure dopo l'assunzione di un pasto misto (Glauber H *et al* 1988, Staopole PW *et al* 1988); a questo incremento corrisponde la riduzione o il mancato aumento dei livelli di peptide C e di insulina. Tale risposta ha suggerito che gli AG n-3 potrebbero impedire alle cellule beta pancreatiche, con meccanismi non ancora identificati, di correggere l'iperglicemia, dal momento che tale cellule non sarebbero in grado di incrementare adeguatamente la produzione e la liberazione di insulina in risposta all'aumento del tasso di glucosio plasmatico (Malasanos TH *et al* 1991).

Gli AG n-3 potrebbero influire negativamente sul compenso glico-metabolico in pazienti diabetici con meccanismi sia pancreatici che extra-pancreatici.

Nel ratto è stata evidenziata la variabilità della composizione degli AG nella membrana delle cellule muscolari: in particolare se si incrementa la quota di AG n-3 si riesce a determinare una maggiore fluidità di membrana. Tale variazione di fluidità comporta una migliore interazione tra l'insulina ed il suo recettore, con conseguente miglioramento dell'insulino-sensibilità (Simopoulos E 2001). La riduzione dell'insulino-resistenza indotta dagli AG n-3 è stata dimostrata nei ratti ma non si hanno tali conferme nell'uomo.

Gli n-3 assumono un ruolo molto importante nel controllo del trasporto degli ioni attraverso le membrane e nella modulazione della trasmissione nervosa sinaptica (Storlien LH *et al* 1991). Sono infatti importanti per un corretto sviluppo del cervello e della vista, soprattutto durante il periodo fetale (Yeuda S *et al* 1999). In particolare modo il cervello umano possiede grosse riserve di DHA.

Anche nelle donne in gravidanza è consigliato un consistente apporto di n-3, in modo da trasmettere sufficienti quantità di DHA al feto nello stadio di formazione, poiché incapace di sintetizzare di per se questi acidi grassi essenziali (Weber PC *et al* 1988, Laugharne J *et al* 1996).

LEGENDA**AA:** Acido Arachidonico;**AG:** Acidi Grassi;**AGE:** Acidi Grassi Essenziali;**AGM o MUFA:** Acidi Grassi Monoinsaturi;**AGP o PUFA:** Acidi Grassi Polinsaturi;**AGP-LC:** Acidi Grassi Polinsaturi a lunga catena;**AGS:** Acidi Grassi Saturi;**AL:** Acido Linoleico;**ALA:** Acido α -Linoleico;**DHA:** Acido Docosaesanoico;**DPA:** Acido Docosapentaenoico;**EPA:** Acido Eicosapentaenoico;**HDL:** High Density Lipoprotein;**LDL:** Low Density Lipoprotein;**VLDL:** Very Low Density Lipoprotein.

CAPITOLO 3

ACIDI GRASSI E REGOLAZIONE GENICA

3.1 I LIPIDI FISIOLGICI

Gli acidi grassi essenziali sono importanti macronutrienti sia per la crescita che per lo sviluppo degli organismi. Sono sia substrati per il metabolismo energetico che componenti strutturali delle membrane biologiche, oltre ad essere coinvolti in numerosi *pathways* di segnale (Jump DB *et al* 1999).

Variazione in quantità o in qualità nella dieta di questi nutrienti possono comportare notevoli cambiamenti fisiologici, molti dei quali sono tessuto-specifici.

Uno squilibrio tra acidi grassi saturi vs insaturi o n-6 vs n-3 è stato visto come cruciale nello sviluppo e nella progressione di diverse malattie croniche. Conseguentemente sia studi clinici controllati che ricerche di base hanno focalizzato l'attenzione nel capire gli effetti biochimici e molecolari di questi nutrienti in condizioni fisiologiche o patologiche.

Gli acidi grassi agiscono su componenti regolatori, strutturali e metabolici nelle cellule. Molti di questi effetti possono essere legati a cambi di composizione di membrana con conseguente azione sui meccanismi di *cell signaling* (Jump DB *et al* 2002; Hwang DH *et al* 2002). Inoltre i loro derivati possono fungere da ormoni e quindi legarsi e regolare l'attività di recettori nucleari controllando le maggiori *networks* coinvolte nel metabolismo cellulare (Gottlicher M *et al* 1992). In letteratura scientifica, numerosi studi riportano che alcuni fattori trascrizionali sono regolati, direttamente o indirettamente, dagli acidi grassi (Fig. 5)

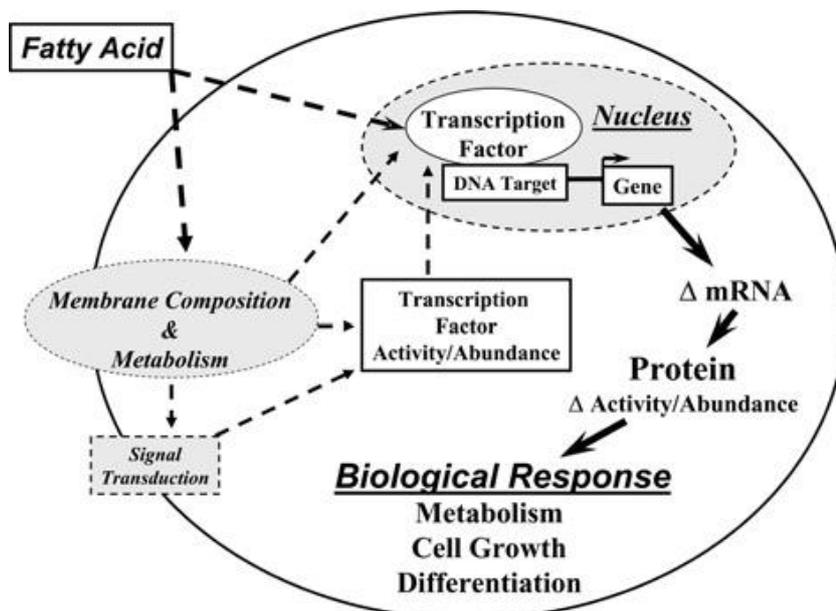


Fig. 5 Regolazione degli acidi grassi della trascrizione genica.

Gli acidi grassi possono dunque modulare la trascrizione genica attraverso differenti meccanismi. Alcuni coinvolgono il legame diretto tra i fattori di trascrizione e queste molecole (es. PPARs, LXR, HNF-4, RXR e ROR); altri invece prevedono meccanismi indiretti (SREBP, NFκB) (Ntambi JM *et al* 2001; Armstrong MK *et al* 1991; Jump DB *et al* 1993; Clarke SD *et al* 1990).

Metodi computazionali di simulazione dinamica molecolare hanno confermato che sia l'EPA che il DHA sono agonisti di PPAR α e γ e inibiscono invece NF-κB (Gani OA *et al* 2008). Questo suggerisce un meccanismo diretto dei PUFA n-3 nella regolazione di geni target e nell'effetto anti-infiammatorio. Inoltre, gli n-3 possono attivare attraverso PPAR α i geni coinvolti nel metabolismo ossidativo dei AG, con conseguente riduzione sia a livello epatico che ematico dei trigliceridi.

Attualmente, gli studi relativi all'interazione degli acidi grassi n-3 con LXR hanno mostrato un effetto tessuto-specifico (Pawar A *et al* 2002). *In vitro*, ad esempio nelle cellule di rene embrionale umano Hek 293, i PUFA sopprimono l'espressione di SREBP-1c attraverso il legame competitivo con LXR, di conseguenza bloccano l'interazione tra l'eterodimero LXR/RXR alla sequenza LXREs nel promotore di SREBP-1c (Yoshikawa T *et al* 2002; Ou J *et al* 2001). Mentre studi *in vivo* sull'espressione genica epatica hanno mostrato che l'attività di LXR non è antagonizzata dai PUFA (Pawar A *et al* 2002).

Anche HNF-4 α interagisce con gli acidi grassi e i loro metaboliti (Petrescu AD *et al* 2002). Mentre i grassi saturi attivano questo fattore di trascrizione (14:0 o 16:0), il legame con 18:3 n-3, 20:5 n-3 o 22:6 n-3 inibisce l'azione di HNF-4 α sulla trascrizione genica (Hertz R *et al* 1998).

Tra i meccanismi indiretti invece possiamo descrivere come esempio l'interazione tra gli acidi grassi e SREBP. Trattamenti *in vitro* di MUFA o PUFA portano ad un arricchimento in membrana di fosfo e sfingolipidi legati a grassi insaturi. Questo evento promuove la ridistribuzione del colesterolo dalle membrane plasmatiche al reticolo endoplasmatico. Inoltre l'attività della sfingomielinasi viene indotta, ottenendo il rilascio di ceramide, quale importante molecola di segnale (Worgall TS *et al* 2002). La conseguenza è la soppressione del processo proteolitico del precursore di SREBP nella sua forma matura e riduzione dei livelli nucleari di SREBP.

In cellule di epatoma umano, gli insaturi (AA EPA e DHA) sopprimono selettivamente i livelli del messaggero di SREBP-1c, mentre nessun effetto viene riscontrato con la somministrazione di acidi grassi saturi (SA) (Caputo M *et al* 2010).

Il gruppo di ricerca di Deng ha riportato che la regione LXRE nel promotore di SREBP non è implicata nell'effetto soppressivo dei PUFA su SREBP. Studi a riguardo devono essere ancora approfonditi, indicando attualmente i PUFA come regolatori a *feedback* negativo di SREBP.

Enfatizzando quindi l'importante relazione tra nutrienti e meccanismi genici, il nostro laboratorio ha condotto uno studio *in vivo*, in cui si è confrontato due tipologie di diete isocaloriche, ma la cui fonte di grassi nella prima derivava dall'olio d'oliva e dall'olio di pesce, mentre nella seconda dal burro, e valutando poi l'effetto delle due diete sull'espressione genica nel tessuto epatico (Eletto D *et al* 2005).

Come approccio sperimentale a supporto di questo tipo di valutazione genica, il nostro laboratorio si è proposto di indagare l'effetto della somministrazione *in vitro* di sieri umani, identificabili come "specchio" delle abitudini alimentari, in maniera diretta sull'espressione genica.

Attraverso sia un'analisi dei dati precedenti (Eletto D *et al* 2005) sia una meta-analisi della letteratura dei recenti anni sui temi in discussione, è stato possibile selezionare quattro geni. La nostra attenzione è stata rivolta allo studio di due importanti fattori implicati nella sintesi degli acidi grassi, ovvero la Sterol Regulatory Element Binding Protein 1 (SREBP-1) e la Stearoyl-CoA Desaturase (SCD), di un enzima epatico del metabolismo di fase II, ovvero l'UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT 1A1); ed infine di una proteina disaccoppiante la fosforilazione ossidativa, Uncoupling protein 2 (UCP2).

3.1.1 SREBP

Le proteine SREBP (SREBPs: *Sterol regulatory element binding proteins*) funzionano come fattori di trascrizione di specifici geni coinvolti nella sintesi del colesterolo, nell'endocitosi di lipoproteine a bassa densità (LDL), nella sintesi degli AG saturi ed insaturi e nel metabolismo del glucosio.

Sono note tre isoforme di SREBP: SREBP-1a, SREBP-1c, codificate dallo stesso gene e SREBP-2, da un gene diverso.

L'omologo nel ratto di SREBP-1 è stato clonato ed è stato definito come Adipocyte Determination and Differentiation factor-1 (ADD1).

Le proteine SREBP sono sintetizzate come precursori dal peso di 125 kDa e sono localizzate nel reticolo endoplasmatico. Il precursore è trasportato

al Golgi da una proteina chaperone (*SREBP-cleavage activating protein*, SCAP) ed è poi tagliato da due proteasi per liberare la forma matura, trascrizionalmente attiva dal peso di 68 kDa.

Numerosi studi hanno dimostrato che la formazione delle proteine mature è controllata dai livelli degli ossisteroli, dei livelli di insulina/glucosio e degli acidi grassi poliinsaturi (PUFA).

Da recenti studi è stato evidenziato che la molecola responsabile dell'inibizione della sintesi del colesterolo non è probabilmente il colesterolo stesso, ma un ossisterolo derivante dall'ossidazione degli steroli.

Uno dei primi geni ad essere identificato come bersaglio dell'azione di controllo esercitata da SREBP è il gene per il recettore delle LDL, il cui promotore contiene una breve sequenza *consensus* di appena dieci paia di basi definita *Sterol Regulatory Element 1* (SRE-1) (Brown MS *et al* 1997, Edwards PA *et al* 1999). L'attività del promotore aumenta quando le cellule incubate sono prive di colesterolo, mentre si riduce quando al mezzo povero di lipidi vengono addizionati LDL o ossisteroli (Goldstein JL *et al* 1990).

I geni *SREBP-1/ADD1* sono membri insoliti della famiglia dei fattori di trascrizione *helix-loop-helix* (letteralmente elica-ansa-elica), il cui dominio base contiene una tirosina al posto di una arginina che è conservata invece in tutti i membri della famiglia (Kim JB. *et al.* 1995).

Tutti i geni che sono attivati da SREBP/ADD1 contengono uno *Sterol Regulatory Element* (SRE) nella sequenza del promotore.

La proteina SREBP ha tre domini funzionali (Brown MS *et al* 1997, DeBose-Boyd RA *et al* 1999):

- Un frammento amino terminale (68 kDa): che funziona come fattore di trascrizione;
- Un dominio centrale che contiene due domini transmembrana (31 amino acidi) legati da un dominio nel lume del reticolo endoplasmatico o Golgi;
- Un dominio carbossi-terminale che regola l'attività della proteina interagendo con un'altra proteina transmembrana del reticolo (SCAP).

Quando la concentrazione degli steroli cellulari si riduce, per esempio a seguito della rimozione di LDL esogene o all'aggiunta di inibitori dell'HMG-CoA reduttasi, il dominio amino terminale di 68 kDa di SREBP viene liberato dalla membrana, entra nel nucleo e si lega al promotore attraverso gli elementi SRE dei geni target, da cui deriva l'attivazione trascrizionale di SREBP. Il taglio di SREBP, invece, è impedito quando le cellule sono ricche di colesterolo/ossisteroli: il risultato è la riduzione dei livelli nucleari di SREBP e della trascrizione dei geni target di SREBP (Fig. 6).

In normali cellule prive di steroli, SCAP funziona come *chaperone* e trasporta le proteine SREBP non ancora mature (125 kDa) dal reticolo endoplasmatico (RE) al compartimento che contiene la proteasi Site 1 (S1P) (Sakai J *et al.* 1998).

Nel RE è presente un precursore inattivo di S1P, la cui attivazione è anche in questo caso dipendente da un taglio proteolitico, cui segue la ricollocazione nell'apparato di Golgi (Espenshade PJ *et al* 1999).

Il trasporto avanzato di SREBP che è necessario nelle cellule prive di steroli, avviene a seguito dell'interazione del dominio carbossi-terminale di

SCAP con il dominio carbossi-terminale di SREBP. Nel Golgi la forma attiva di S1P taglia il *loop* citoplasmatico di SREBP per generare due frammenti di membrana.

Il taglio di SREBP, mediato da S1P, deve avvenire prima del taglio di Site protease (S2P), una metalloproteasi (Zn), che taglia il frammento amino terminale di SREBP nel dominio transmembrana. Questo secondo taglio avviene a livello di un legame leucina/cisteina. Il taglio di SREBP da parte di S2P avviene sul dominio amino-terminale trascrizionalmente attivo di 68kDa liberandolo dal frammento trans-membrana (Brown MS *et al* 1997). Il frammento poi raggiunge il nucleo per attivare i geni bersaglio.

Nelle cellule ricche di colesterolo, SCAP e SREBP non riescono a migrare nel Golgi ma restano in un compartimento subcellulare distinto dal compartimento contenente S1P attivo (DeBose-Boyd RA *et al* 1999) e quindi viene inibita la maturazione e la localizzazione nucleare di SREBP. L'eccesso di steroli a livello cellulare si traduce in un aumento della degradazione delle proteine SREBP-1 localizzate nel nucleo.

Di conseguenza nelle cellule ricche di steroli si osserva una riduzione della trascrizione dei geni target di SREBP.

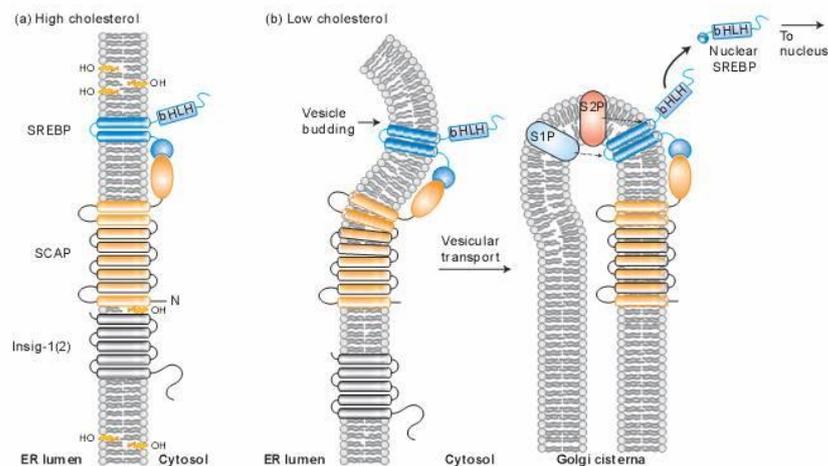


Figura 6. Meccanismo di attivazione di SREBP

Tra i geni sotto il controllo di SREBP sono stati identificati numerosi coinvolti nella sintesi del colesterolo, nell'*uptake* delle LDL, nella sintesi e insaturazione degli AG, nella sintesi dei trigliceridi e nel metabolismo del glucosio.

Le proteine SREBP-1a, 1c e 2 attivano preferenzialmente geni diversi: SREBP-2 attiva geni coinvolti maggiormente nella sintesi del colesterolo; al contrario SREBP-1 attiva principalmente geni coinvolti nella sintesi degli AG (Guan G *et al* 1997, Ericsson J *et al* 1997).

Recenti studi hanno dimostrato che SREBP-1c svolge un ruolo distinto nell'attivazione di geni coinvolti nel metabolismo del glucosio.

L'espressione di SREBP-1 è regolata dagli stati nutrizionale ed ormonale dell'organismo; infatti è ormai noto che i PUFA riducono i livelli nucleari di SREBP-1, mentre insulina e ossisteroli li aumentano (Brown MS *et al* 1986). La riduzione dell'espressione dei geni target di SREBP-1 non è stata osservata quando i topi transgenici, che esprimono forme mature di SREBP-1a, venivano alimentati con i PUFA (Yahagi N *et al* 1999).

È stato osservato che in cellule in coltura, l'addizione dei PUFA al mezzo minimo riduce i livelli e l'attività delle forme mature di SREBP. I risultati di questi studi indicano che i PUFA impediscono il taglio/maturazione di SREBP-1 (Edwards PA *et al* 2000)

Un altro meccanismo proposto a tal riguardo prevede l'intervento di un altro recettore nucleare, PPAR α (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*) (Edwards PA *et al* 1999). Questo recettore è attivato da fibrati, eicosanoidi ed acidi grassi, tra cui il DHA [anche se l'effetto per quest'ultimo dipende dal tipo di cellule (Peet DJ *et al* 1998)] ed attiva la trascrizione di enzimi coinvolti nella degradazione dei lipidi. PPAR α attivato dimerizza con RXR con un meccanismo definito permissivo (DeBose-Boyd RA *et al.* 1999), sottraendo il partner comune all'associazione con altri recettori nucleari, tra cui LXR, per cui ne inibisce l'attivazione (Fig. 7). Questo meccanismo fa riflettere su una probabile comunicazione tra i diversi recettori nucleari che attivano la trascrizione di enzimi coinvolti in diversi processi metabolici.

E' stato dimostrato che i livelli di mRNA di SREBP-2 e -1 vengono differentemente regolati in risposta al trattamento con i farmaci ipolipidemici o insulina (Shimomura I *et al* 1999); ciò sta ad indicare che l'espressione dell'mRNA e delle proteine per le tre isoforme di SREBP può essere regolata indipendentemente a diversi livelli.

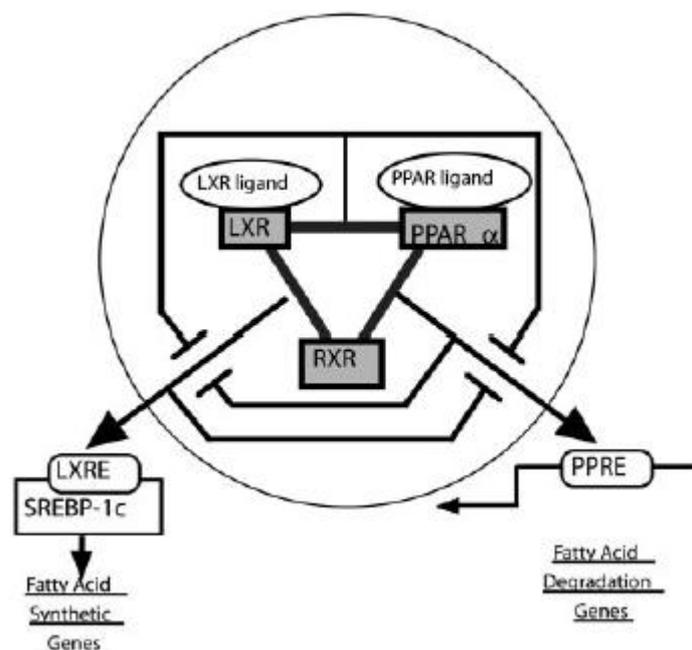


Figura 7. Regolazione di SREBP

In Fig. 7 è schematizzata la contrapposizione degli effetti degli eterodimeri di alcuni recettori nucleari coinvolti nell'omeostasi dei lipidi: da un lato la formazione dell'eterodimero LXR/RXR determina l'attivazione di SREBP-1c, attraverso le sequenze LXRE sul promotore; dall'altro la formazione del complesso PPAR/RXR rende meno disponibile il *pattern* comune, RXR, all'associazione con altri recettori inibendo l'attivazione di SREBP.

3.1.2 SCD

Stearoyl-CoA desaturase (SCD) è un enzima microsomiale necessario per la biosintesi dell'oleato (18:1) e palmitoleato (16:1) che sono i maggiori MUFA presenti a livello delle membrane, sottoforma di fosfolipidi, trigliceridi ed esteri del colesterolo. SCD è coniugato con NADPH, la citocromo b5 reduttasi e il citocromo b5 ed in presenza di ossigeno molecolare introduce un doppio legame negli acil-CoA (Jeffcoat R *et al* 1979).

L'enzima rimuove per primo l'atomo di idrogeno dal carbonio 9, a cui fa seguito la rimozione del secondo atomo di idrogeno dal carbonio 10. Questo passaggio specifico è in relazione alla posizione in cui il doppio legame viene introdotto in modo che la stereochimica del legame tra il carbonio 9 ed il carbonio 10 sia ben stabilita (Clandinin MT *et al* 1991).

La reazione di desaturazione degli acidi grassi è una reazione di ossidazione che richiede ossigeno molecolare e tre elettroni. L'ossigeno stesso non è incorporato nella catena degli AG, ma viene rilasciato sotto forma di acqua (Ntambi JM *et al* 1995).

L'introduzione del primo doppio legame *cis* nella posizione $\Delta 9$ (tra il C9 e il C10) è il passaggio critico nella biosintesi dei MUFA. I substrati preferiti sono il palmitoil e lo stearoil CoA che sono poi convertiti rispettivamente in palmitoleoil ed oleil-CoA.

L'acido oleico e palmitoleico sono MUFA che nell'uomo sono presenti principalmente a livello del tessuto adiposo, nelle membrane dei fosfolipidi e dei globuli rossi (Zhang L *et al* 1999). Sono coinvolti nella regolazione dello sviluppo e della differenziazione cellulare attraverso effetti sulla fluidità delle membrane e sui segnali di traduzione.

I MUFA hanno effetti anche sull'apoptosi e potrebbero essere coinvolti nella mutagenesi di alcuni tumori.

I MUFA sono sintetizzati da SCD e sono considerati i principali substrati per la sintesi di varie specie di lipidi quali fosfolipidi, trigliceridi e gli esteri del colesterolo.

Nel organismo murino sono state identificate tre isoforme del gene SCD (SCD1, SCD2, SCD3) (Mori TA *et al* 1999, Mori TA *et al* 2000), in ratto due (Thiede MA *et al* 1998). Nell'uomo è stato caratterizzato un solo gene SCD funzionale, sul cromosoma 10; il secondo gene identificato sul cromosoma 17 è considerato uno pseudogene (Zhang L *et al*.1999).

La struttura del promotore di SCD nell'uomo è molto simile all'isoforma SCD1 nel topo, in cui sono conservate le sequenze regolatrici per il legame con diversi fattori di trascrizione quali SREBP, CAAT C/EBP α (*enhancer binding protein-alpha*) e NF-1(*nuclear factor-1*) coinvolti nella *trans*-attivazione del gene SCD1 nel topo.

Da studi condotti è stato osservato che SREBP gioca un ruolo centrale nella regolazione del gene SCD umano (in particolare SREBP 1a e SREBP 1c *trans*-attivano il promotore in modo dose-dipendente).

È stato osservato che le espressioni del gene SCD umano e del gene SCD nel topo sono entrambe ridotte dall'azione dei PUFA e del colesterolo (Fig. 8).

I geni SREBP si legano a SRE nei geni SCD 1 e SCD 2 nel topo e da ciò risulta l'attivazione dei loro promotori (Singh M *et al* 1998). Il promotore

del gene SCD umano ha le sequenze SRE nelle stesse posizioni di quelle del gene SCD 1 nel topo.

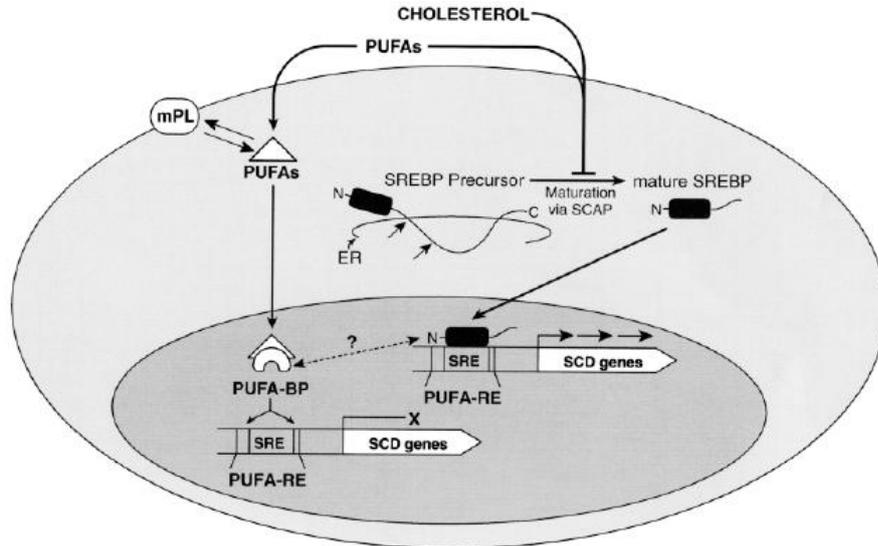


Figura 8. Espressione e regolazione di SCD

In condizioni normali di alimentazione l'mRNA di SCD1 è espresso nel tessuto adiposo bianco (*white adipose tissue: WAT*), nel tessuto adiposo bruno (*brown adipose tissue: BAT*), nelle ghiandole tarsali (di Meibomio), nelle ghiandole prepuziali ed è espresso nel fegato in seguito ad una dieta ricca di carboidrati (Zheng Y *et al* 2001). SCD 2 è principalmente espresso nel cervello (Kaestner KH *et al* 1989) ed è indotto durante la formazione di mielina nel periodo neonatale. Allo stesso modo di SCD 1, i livelli di mRNA di SCD 2 sono espressi in minori quantità nel rene, nella milza, nel cuore e nel polmone dove è indotto in risposta ad elevati livelli di carboidrati nella dieta (Kim YC *et al* 1999). I livelli di m-RNA di SCD 2 sono espressi durante la maturazione dei linfociti B e sono down-regolati durante la maturazione dei linfociti T (Tebbey PW *et al* 1992).

Una dieta ricca di carboidrati, l'insulina, il glucosio ed il fruttosio (Sessler AM *et al* 1996, Waters KM *et al* 1994), il colesterolo, la luce, alcuni farmaci (fibrati, agonisti di LXR α) (Repa JJ *et al* 2000), l'acido retinoico (85, 89, 90) inducono l'espressione epatica del gene SCD 1. I MUFA, soprattutto la famiglia degli AG n-6 ed n-3 (Waters KM *et al* 1996), l'acido linoleico coniugato (CLA: *conjugated linoleic acid*) (Choi Y *et al* 2000), c-AMP (o farmaci che ne aumentano i livelli), *tumor necrosis factor α* e l'ormone tiroideo (Waters KM *et al* 1997), inibiscono la trascrizione dell'm-RNA del gene SCD 1 a livello del fegato.

3.1.3 UGT 1A1

Gli enzimi ad attività UDP-glucuronosiltransferasica (UGTs) utilizzano l'acido uridin 5'-difosfoglucuronico (UDPGlcUA) come donatore dell'acido glucuronico che viene trasferito ad un substrato. I β -D-glucuronidi possono essere formati attraverso legami idrossilici, carbossilici, solforilici, carbonilici ed amminici, pertanto migliaia di composti possono risultare bersaglio della reazione di glucuronidazione. Tale reazione è in grado di trasformare composti lipofili in derivati a maggior idrofilia, incrementando la loro capacità di ripartirsi nella fase acquosa dei compartimenti intra- ed extracellulari, facilitandone così l'escrezione e l'eliminazione attraverso la bile e l'urina (Dutton GJ *et al* 1980).

Attualmente sono stati codificati 15 cDNA per UGT, otto codificati dal gene UGT1A e sette dal gene UGT2.

Nell'uomo il locus UGT1A (Ritter JK *et al* 1992) è localizzato sul cromosoma 2-q37 (Clarke DJ *et al* 1997) e codifica per UGT1A1 (Ebner T *et al* 1993), UGT1A3, UGT1A4, UGT1A5 (trascritto non attivo), UGT1A6, UGT1A7, UGT1A8, UGT1A9 ed UGT1A10 (Tukey RH *et al* 2000). Anche se sono risultati attivi solo otto trascritti, il locus UGT1A codificherebbe per 12 differenti mRNA. Esso è costituito da 160 Kb, con quattro esoni fiancheggiati 3' e 12 possibili esoni al 5', ognuno codificante per un membro della famiglia degli UGT1A (Owens IS *et al* 1995). La regione fiancheggiante l'estremità 5' di ogni primo esone possiede un sito di riconoscimento per la Pol II e per i fattori del complesso di pre-inizio. Al 3' di ogni primo esone si possono identificare regioni di legame agli spliceosomi, per gli eventi di splicing, come mostrato in Fig. 9 (Hodges D *et al* 1994). Pertanto mediante splicing alternativo al primo esone si ottengono le diverse isoforme, per cui le proteine differiscono per la zona amino-terminale, mentre risultano identiche per la regione carbossi-terminale (245 aa) codificata dagli esoni 2-5. Le proteine della famiglia UGT2 sono codificate da sei esoni.

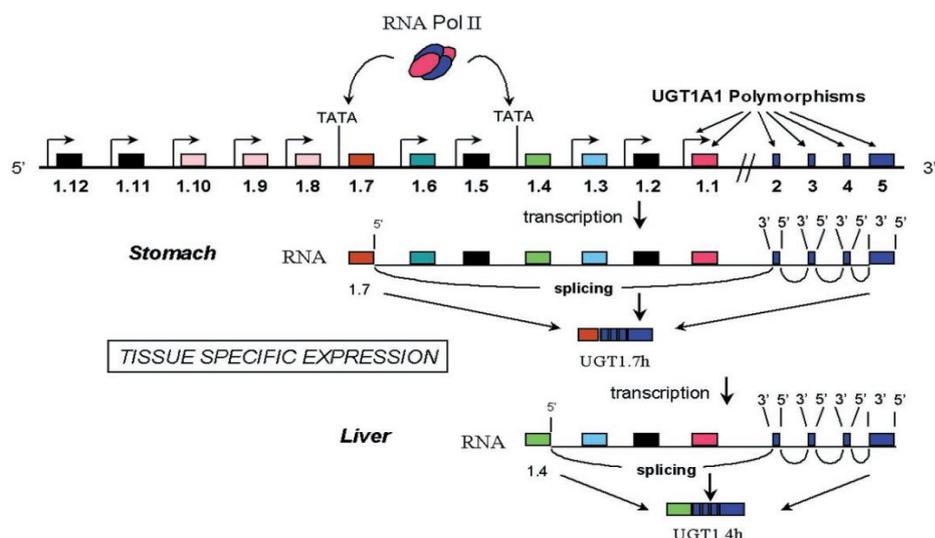


Figura 9. Rappresentazione del locus di UGT1A ed esempio della sintesi di differenti RNA per splicing alternativo

La grandezza delle proteine UGT varia da 529 a 534 aminoacidi (Wooster R *et al* 1993) e, tranne per UGT1A10, è presente una sequenza segnale amino-terminale (Strassburg CP *et al* 1997), che viene rimossa dopo l'inserimento nel reticolo endoplasmatico (Mackenzie PI *et al.* 1984). La regione amino-terminale potrebbe determinare la specificità per il substrato da parte delle diverse isoforme (Mackenzie PI. *et al* 1990), anche se è stato osservato che anche il dominio carbossi-terminale risulta importante per l'attività dell'enzima (Li Q *et al* 1997).

Le isoforme 1A1, 1A3, 1A4, 1A6 ed 1A9 risultano espresse principalmente a livello epatico, anche se ne è stata rilevata l'espressione anche a livello del colon dello stomaco e dei dotti biliari (Strassburg CP *et al* 1999). UGT1A7 ed UGT1A10, invece, sono stati scoperti e studiati nei tessuti gastrici e biliari, indicando la loro localizzazione esclusivamente a livello extraepatico (Strassburg CP *et al* 1997). Per quanto riguarda le proteine della famiglia UGT2 è stato osservato che la loro espressione è di importanza rilevante nei tessuti sensibili agli steroidi, come la prostata e la ghiandola mammaria. Per esempio, le isoforme 2B10, 2B11, 2B15 e 2B17 sono state identificate a livello della prostata e 2B11 è anche espresso nella ghiandola mammaria. UGT2A1 è coinvolto nei meccanismi di difesa in atto a livello della mucosa nasale, mentre 2B4 è prettamente epatico e 2B7 è espresso nell'esofago, nel fegato, nell'intestino, nel pancreas ed a livello renale (Strassburg CP *et al* 1999).

Da numerosi studi riguardanti l'attività enzimatica è stata valutata la selettività dei substrati da parte di ogni isoforma. La tabella 1 mostra come UGT1A1 risulti specifico per la glucuronidazione dei gruppi carbossilici (Tukey RH and Strassburg CP *et al* 2000). È importante notare come la bilirubina sia glucuronidata esclusivamente da UGT1A1 (King CD *et al* 1996), pertanto patologie in cui si osserva un errato metabolismo della bilirubina sono da ricondurre ad anomalie nell'isoforma 1A1.

Chemical class	1A1	1A3	1A4	1A6	1A7	1A8	1A9	1A10	2A1	2B4	2B7	2B15	2B17
Simple phenols	1900	239	30	2400	175	1346	5300	88	735	0.4	5	167	38
Complex phenols	420	299	11	13300	480	2217	1200	85	2440	0.2	3	176	7
Aliphatic alcohols	ND	0	75	ND	ND	0	270	ND	1290	0	388	41	ND
Anthraquinones/flavones	1720	1072	0	0	57	1534	2500	35	320	ND	ND	103	ND
Coumarins	800	1970	0	1100	220	4970	1500	11	898	0	4	170	0
Bilirubin	400	0	2	0	0	ND	0	ND	ND	0	0	0	0
Bile acids	0	10 ^b	0	0	ND	ND	0	0	ND	1.8	20	0	0
Carboxylic acids	0	121	0	ND	0	0	170	0	68	0	1.8	0	ND
Primary amines	0.3	84	540	10600	0	42	1800	0	22	ND	2.5	0	ND
Secondary amines	0	12	240	ND	ND	15	ND	20	ND	ND	ND	0	ND
Tertiary amines	0	87	165	1	0	0	0	0	ND	0	0	0	0
Heterocyclic amines	0	49	ND	50	3	71	91	156	ND	ND	ND	ND	ND
Opioids	0	130	0	0	ND	126	0	ND	73	0	3462	0	ND
C ₁₈ steroids	350	313	25	0	6	711	450	48	40	0.3	980	14	0
C ₁₉ steroids	0	0	110	0	0	43	0	4	207	0	2	73	15
C ₂₁ steroids	0	ND	130	ND	ND	0	ND	ND	53	0	0	ND	8
Sapogenins	0	0	330	ND	ND	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Tabella 1. Attività enzimatica relativa ad ogni isoforma in relazione a diverse classi di substrati. (Valori espressi in picomoli per minuto per milligrammo di proteine)

Le *iperbilirubinemie* da bilirubina non coniugata, di tipo ereditario, sono tutte da ricondurre a mutazioni alleliche di UGT1A1 (Aono S *et al* 1994, Seppen J *et al* 1994) o polimorfismi a livello del promotore (Bosma PJ *et al* 1995, Monaghan G *et al* 1996).

Inoltre, mutazioni alleliche per UGT1A potrebbero essere alla base di altre patologie, come malattie neoplastiche ed epatiti di tipo autoimmune (Tukey RH *et al*. 2000).

La valutazione dell'importante ruolo dell'enzima UGT1A1 e delle patologie ad esso correlate, hanno suscitato un interesse sempre maggiore nei confronti di questa proteina. I primi studi a livello del promotore genico di UGT1A1 hanno rivelato una sequenza -3499/-3210 dal sito di inizio della trascrizione, nota come gtPBREM, che risulta regolata dal recettore nucleare CAR (o NR1I3). Il fenobarbital, infatti, essendo ligando del recettore CAR è capace di indurre l'espressione di UGT1A1 (Sugatani J *et al* 2001). E' stato poi osservato che la sequenza gtPBREM risulta costituita da 290-bp e contiene le sequenze di riconoscimento per 5 recettori nucleari: PXR (Xie W *et al* 2003), AhR (Yueh MF *et al* 2003) e sequenze DR4, gtNR1 e DR3 (Sugatani J *et al* 2001), anche se non è ancora completamente chiaro il ruolo di queste sequenze nella regolazione del promotore. E' invece documentata la regolazione dell'espressione del gene in relazione all'attivazione del recettore PXR. Tale recettore è riconosciuto ed attivato da un acido biliare secondario, l'acido litocolico (LCA), prodotto da un acido biliare primario, l'acido chenodesossicolico (CDCA), mediante 7 α -deidrossilazione determinata da alcuni batteri intestinali. Altri ligandi sono il pregnenolone, il progesterone, l'androstano, l'iperforina, il desametasone e vari xenobiotici e flavonoidi (Sugatani J *et al* 2004). Non sono note regolazioni dirette di UGT1A1 da parte degli acidi grassi n-3, ma è documentato il legame del DHA al recettore RXR (Mata de Urquiza A *et al* 2000), che coopera con i recettori nucleari, tra cui PXR e CAR, nel riconoscimento delle sequenze specifiche.

3.1.4 UCP2

Le proteine disaccoppianti (UCPs) sono codificate da DNA nucleare e sono localizzate nella membrana interna mitocondriale. La loro primaria funzione è quella di traslocare i protoni dallo spazio intermembrana alla matrice mitocondriale. Sono infatti dette disaccoppianti in quanto riducono l'attività dell'ATP sintetasi nella produzione di ATP, dissipano l'energia in forma di calore, diminuiscono la produzione dell'anione superossido e limitano l'entrata del calcio nella matrice mitocondriale (Nicholls DG *et al* 1984; Nicholls DG *et al* 2001 Bouillaud F *et al* 1985; Lowell BB *et al* 2000).

La prima proteina di questa famiglia, ben caratterizzata e scoperta negli anni 60, è stata UCP1, focalizzando l'interesse soprattutto sul suo ruolo termogenico nel tessuto adiposo bruno, in quanto coinvolta in meccanismi sia di deposito che di mobilitazione dei grassi in condizioni ad esempio di restrizioni dietetiche o a particolari temperature.

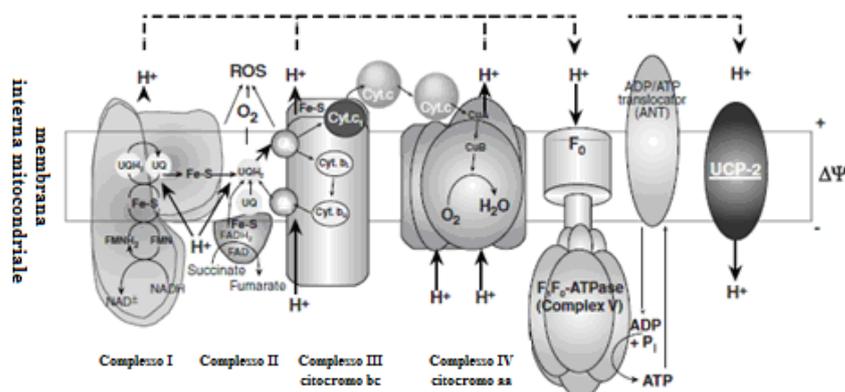


Figura 10. Rappresentazione UCP2 nella membrana mitocondriale.

Dieci o undici residui identificati in UCP1 sono conservati in UCP2, suggerendo quindi che le funzioni principali sono conservate in quest'ultima (Fig.10).

Il meccanismo del disaccoppiamento mitocondriale ancora non è stato del tutto chiarito, e sono possibili due ipotesi:

- UCPs trasportano direttamente i protoni (Klingenberg M *et al* 1999)
- UCPs trasportano gli acidi grassi non esterificati fuori dalla matrice in un processo chiamato ciclo degli acidi grassi (Joseph JW *et al* 2002)

Entrambi i processi riducono il gradiente protonico attraverso la membrana mitocondriale e disaccoppiano la produzione di ATP. UCP2 è attivata dagli acidi grassi in frazione libera (AGL), secondo due possibili processi. Il primo propone che AGL donano H^+ direttamente alle proteine disaccoppianti, che traslocano i protoni verso la matrice (Echtay KS *et al* 2002). Il secondo invece suggerisce che AGL protonati attraversano la membrana interna mitocondriale, rilasciano H^+ nella matrice e monovalenti

vengono ritrasportati all'esterno della membrana mitocondriale proprio dalle proteine disaccoppianti (Garlid KD *et al* 1996).

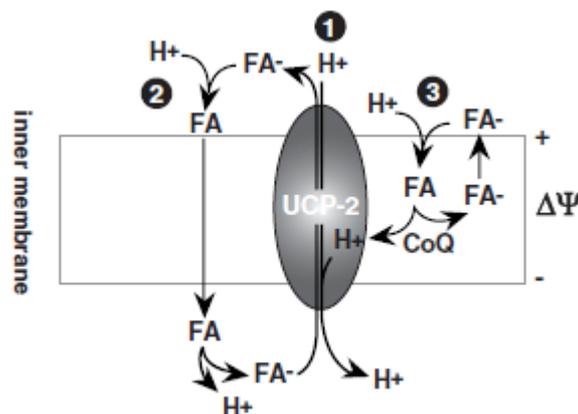


Figura 11. Ciclo degli acidi grassi.

Il gene che codifica per UCP2 è localizzato nel cromosoma 11 e il suo messaggero è abbondante nella milza, timo, cellule β pancreatiche, cuore, polmoni, tessuto adiposo bianco, stomaco, mentre si trova in quantità inferiori nel cervello, reni, fegato e a livello muscolare (Echtay KS *et al* 2002; Fleury C *et al* 1997 and 1999) .

UCP2 è stata scoperta nel 1997 e il ruolo proposto era principalmente coinvolto nella modulazione della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e nel metabolismo lipidico (Fig.11). La variazione nell'attività e nell'espressione di questa proteina può contribuire in meccanismi di morte cellulare, obesità e disordini ad essa connessi (Collin A *et al* 2005).

L'ipotesi che il messaggero di UCP2 possa essere indotto da AGL è stato innanzitutto dimostrata sia nei muscoli scheletrici e nel tessuto adiposo (Saleh MC *et al* 2002). In coltura cellulare preadipocitica, gli acidi grassi insaturi inducono marcatamente l'espressione di UCP2 (Reilly JM *et al* 2000). Numerose altre linee cellulari del cuore, del fegato o del pancreas anche hanno mostrato responsività alla somministrazione di differenti acidi grassi con aumento dei livelli del messaggero di UCP2 (Van Der Lee KA *et al* 2000; Lameloise N *et al* 2001) . Per esempio in cellule β del pancreas è stato dimostrato che gli acidi grassi saturi sono capaci di indurre l'espressione di questa proteina (Medvedev AV *et al* 2002). La responsività agli acidi grassi si esprime a livello trascrizionale, infatti l'aggiunta di actinomomicina D al mezzo di coltura cellulare blocca l'upregolazione di UCP2 da parte di queste molecole (Reilly JM *et al* 2000). L'apparente mancanza di specificità da parte degli acidi grassi è invece smentita dalla regolazione invece tessuto specifica.

La regolazione di UCP2 da parte degli acidi grassi può essere espletata a livello del promotore con un'interazione diretta. Gli AGL modulano UCP2 sia tramite PPARs che SREBP.

In letteratura scientifica numerosi evidenze dimostrano che FFA inducono la trascrizione di geni coinvolti nell'ossidazione lipidica epatica e nel tessuto adiposo, e UCP2 rientra tra questi.

Gli acidi grassi insaturi modulano infatti UCP2 agendo sia come ligandi che come attivatori delle varie isoforme di PPAR in maniera tessuto specifica (Nakatani T *et al* 2002).

Un pathway alternativo di regolazione di UCP2 da parte dei AGL è attraverso SREBP, infatti, ad esempio, i poliinsaturi riducono l'espressione di SREBP1 e di conseguenza inibiscono la codificazione di geni regolati da questo fattore di trascrizione. UCP2 appartiene a questa coorte di geni, in particolare l'effetto è stato dimostrato nel tessuto epatico, in quanto la proteina disaccoppiante ha un ruolo importante nel metabolismo di ossidazione dei lipidi (Medvedev AV *et al* 2002; Duplus E *et al* 2002; Takahashi A *et al* 2005).

espresso sia nel fegato che in altri tessuti steroidogenici (Hansen GH *et al* 2003).

Una volta che il colesterolo è stato assorbito a livello enterocitico, può essere sia nuovamente trasportato nel lume intestinale dai trasportatori ABC (ABCG5 e ABCG8) (Ostlund RE *et al* 2002) o in alternativa può essere esterificato dall'enzima acil-CoA colesterolo aciltrasferasi (ACAT) (Sehayek E *et al* 1998), assemblato in chilomicroni e questi secreti poi nel torrente circolatorio. Le dimensioni dei chilomicroni vengono marcatamente ridotte ad opera della lipasi ed i trigliceridi rimossi da recettori epatici. La parte del colesterolo assunto con la dieta è convertita in sali biliari ed è regolata dalla circolazione entero-epatica; la parte rimanente e anche quella più abbondante, è invece incorporata nelle lipoproteine a densità molto bassa (VLDL) (Fig.13).

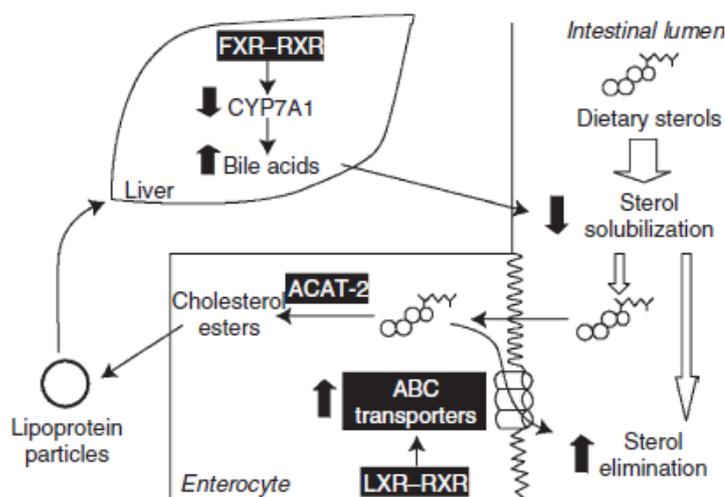


Figura 13. Meccanismi coinvolti nell'assorbimento del colesterolo endogeno.

La biosintesi epatica di colesterolo endogeno è controllata dalla sua stessa concentrazione intracellulare secondo un meccanismo di regolazione a *feedback* negativo. L'enzima chiave nella sua biosintesi è l'idrossi-metilglutaril-CoA reduttasi (HMGCoA-reduttasi), responsabile di convertire l'idrossimetilglutaril-CoA in acido mevalonico, precursore del colesterolo.

L'altro meccanismo di compenso invece a *feedback* positivo è rappresentato dalla eliminazione dei sali biliari e del colesterolo nella bile.

Una volta secrete dal fegato, le VLDL subiscono l'idrolisi da parte della lipasi endoteliale con formazione di lipoproteine a densità intermedia (IDL). Una parte delle IDL è rimossa dagli epatociti per essere catabolizzata, mentre il 50-90% è convertito in LDL, per azione della lipasi epatica. La captazione delle LDL da parte delle cellule avviene secondo un processo di endocitosi recettore-mediata (Phan CT *et al* 2001).

Recenti studi hanno mostrato che la famiglia dei fattori trascrizionali sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) gioca un ruolo chiave

nella regolazione della sintesi del colesterolo nel fegato. L'attivazione di questo fattore stimola sia l'espressione dei recettori delle LDL che la sintesi lipidica, agendo nettamente sui livelli di colesterolo ematico (Horton JD *et al* 2002).

Anche liver X receptor (LXR) incide sulla regolazione del colesterolo, in particolare esso riduce la sintesi di colesterolo mediante SREBP 2. Ciò avviene nel fegato, mentre a livello intestinale LXR induce l'*upregolazione* di specifiche proteine trasportatrici del colesterolo (come ad esempio, ABC transporters e I-BABP) essenziali sia nell'assorbimento che nella sua eliminazione e di conseguenza importanti nel bilanciare finemente la concentrazione endogena del colesterolo (Millatt LJ *et al* 2003; Chen H *et al* 2001).

4.2 IPERCOLESTEROLEMIA

Uno dei principali fattori di rischio nello sviluppo di malattie cardiovascolari è l'ipercolesterolemia (Stamler J *et al* 1986). Studi *in vivo* hanno mostrato che animali sani dopo una dieta ricca in colesterolo hanno sviluppato lesioni aterosclerotiche (Moghadasian MH *et al* 2002). Ricerche successive hanno quindi indagato il processo patofisiologico sotteso a questo processo, con particolare interesse al ruolo delle lipoproteine a bassa densità legate al colesterolo (LDL-C). La sua forma ossidata insieme con mediatori pro-apoptotici e pro-infiammatori gioca un ruolo essenziale nell'innesco dei pathways coinvolti nella formazione delle placche aterosclerotiche e nella loro conseguente rottura (Falk E *et al* 2006). In particolare i livelli LDL-C intorno a 200 mg/dl sono fortemente associati al rischio di malattie coronariche (Law N and Wald MJ 2006).

In condizioni di digiuno il colesterolo nel sangue è per la maggior parte (60-75%) associato alle LDL, per cui il dosaggio del colesterolo plasmatico totale è un indice, anche se approssimativo, del colesterolo LDL. Tuttavia, poiché una buona percentuale di colesterolo è trasportato anche da altre lipoproteine (VLDL e HDL), è preferibile per una più esatta valutazione della colesterolemia dosare specificamente le LDL. Questa modalità permette di distinguere il colesterolo LDL (detto anche comunemente "cattivo") da quello HDL ("buono").

Le LDL, derivanti dal metabolismo delle VLDL di sintesi epatica, trasportano il colesterolo dal fegato ai tessuti; al contrario, le HDL rimuovono il colesterolo in eccesso dai tessuti e lo trasportano al fegato, dove viene poi eliminato nel lume intestinale in parte come sali biliari e in parte come colesterolo libero. Le HDL svolgono quindi una funzione protettiva sullo sviluppo delle malattie cardiovascolari.

L'identificazione dell'ipercolesterolemia quale fattore di rischio cardiovascolare è il risultato di una lunga serie di studi epidemiologici.

Confrontando gruppi di individui di diversi paesi, è stata valutata l'incidenza della mortalità per cardiopatia ischemica e la sua relazione con alcuni possibili fattori di rischio, quali ad esempio la dieta.

Il *Seven Countries Study* (Kromhout D 1999) è uno dei più famosi di questi studi.

In esso sono stati indagati, per 25 anni, 12.770 uomini di età fra 40 e 59 anni, in sette paesi: Olanda, Finlandia, Grecia, Jugoslavia, Italia, Giappone e USA. La Finlandia presentava la più alta mortalità per cardiopatia ischemica ed il Giappone la più bassa.

Con eccezione del Giappone, dove sia i decessi per cardiopatia ischemica sia i valori di colesterolemia erano particolarmente bassi tanto da impedire un calcolo statistico significativo, i due principali fattori di rischio emersi dallo studio sono stati l'ipertensione e la colesterolemia, a sua volta in rapporto con il contenuto di grassi della dieta.

In un famoso studio pubblicato nel 1984, *Ni-Hon-San Study*, (Takeya Y *et al* 1984) è stata rilevata l'incidenza di cardiopatia ischemica tra 12.000 uomini di origine giapponese e residenti in Giappone, Hawaii e California; è risultato che i giapponesi che vivevano nelle Hawaii e in California avevano un'incidenza di cardiopatia ischemica quasi doppia rispetto a quelli che vivevano in Giappone, ma pur sempre la metà rispetto agli statunitensi di razza caucasica. Da questi dati è emersa l'importanza dei fattori ambientali nello sviluppo della cardiopatia ischemica. Fra i numerosi studi longitudinali hanno una particolare importanza, per durata o per numero di individui esaminati, due studi:

- il Framingham Heart Study iniziato nel 1949 (Dawber TR *et al* 1951) e tuttora in corso interessa circa 5000 individui di entrambi i sessi e senza malattie cardiache al momento del reclutamento, che vengono controllati ogni 2 anni.

- il MRFIT (*Multiple Risk Factor Intervention Trial*), iniziato nel 1973 e durato 16 anni, ha reclutato circa 360.000 soggetti sani.

Questi studi prospettici hanno dimostrato che il rischio di morte per cardiopatia ischemica è strettamente proporzionale ai livelli di colesterolemia.

I primi studi prospettici (*Framingham Heart Study*, 1971; *Pooling Project*, 1978; *Israeli Prospective Study*, 1985) suggerivano che il rischio di un nuovo evento ischemico non era correlato con livelli superiori a 200 mg/dl di colesterolemia totale (circa 130 mg/dl di LDL); quelli successivi di maggiori dimensioni, il MRFIT in particolare, hanno chiaramente confermato che la correlazione tra colesterolemia e mortalità cardiovascolare non può essere individuata con un valore soglia. Inoltre da questi studi è emerso che i vari fattori di rischio esaminati (principalmente ipertensione, fumo, diabete, obesità, familiarità per cardiopatia ischemica e bassi livelli di HDL) si potenziano a vicenda, per cui tanto più numerosi sono i fattori di rischio in un singolo individuo, tanto maggiore sarà la probabilità di morte per cause cardiovascolari.

A sostegno del ruolo causale della colesterolemia nella patologia cardiovascolare sopravvivono gli studi sperimentali, che hanno accertato l'importanza del ruolo delle LDL coinvolto nella patogenesi dell'aterosclerosi. Introdotti con la dieta, i grassi saturi, i trans-monoin saturi e, in minor misura, il colesterolo sono i diretti responsabili dell'aumento dei livelli plasmatici delle LDL; i nutrienti invece che abbassano le LDL comprendono gli acidi grassi poliinsaturi e, in minor grado, le fibre e le proteine della soia. Alcuni acidi grassi monoin saturi hanno un effetto neutro (come i carboidrati) sulla colesterolemia (Katcher HI *et al* 2009).

Quindi la dieta ha un ruolo cruciale nell'induzione della colesterolemia, mentre altri fattori, ambientali e genetici, hanno probabilmente un ruolo nel creare le differenze di mortalità coronaria tra le varie popolazioni.

Secondo le attuali linee guida internazionali (*ATP III, Adult Treatment Panel*):

- ✓ i valori ideali di colesterolemia in un soggetto senza fattori di rischio cardiovascolare o con un solo fattore corrispondono a 160 mg/dl di colesterolo LDL o meno
- ✓ i valori ideali in un soggetto con più di 1 fattore di rischio sono di 130 mg/dl di LDL o meno
- ✓ i valori ottimali per un soggetto con cardiopatia ischemica o diabete sono 100 mg/dl di LDL o meno.

La presenza di alti livelli di HDL (>60 mg/dl) costituisce un fattore protettivo, per cui si parla di fattore di rischio negativo.

4.2.1 CLASSIFICAZIONE DELL'IPERCOLESTEROLEMIA

L'innalzamento dei valori plasmatici delle LDL può determinarsi attraverso due meccanismi fisiopatologici:

1. Aumento della produzione epatica delle VLDL, quali precursori delle LDL; quindi un'eccessiva produzione di VLDL comporta necessariamente un aumento delle LDL plasmatiche.
2. Insufficiente rimozione delle LDL dal circolo per deficit dei recettori specifici LDL-R

In base alle cause, le ipercolesterolemie possono essere distinte in primitive o secondarie. Le prime non risultano associate ad altre malattie che possono alterare il metabolismo lipidico, mentre le seconde sono causate da altre affezioni in grado di influenzare il metabolismo delle lipoproteine (cirrosi biliare primitiva, epatopatie con stasi biliare, diabete mellito, ipotiroidismo, sindrome nefrosica, uso prolungato di farmaci come i cortisonici e contraccettivi orali).

Le ipercolesterolemie primitive comprendono una forma più frequente (>85% delle ipercolesterolemie), detta *ipercolesterolemia poligenica*, e meno frequenti invece le forme familiari, tra le quali la più comune è la *ipercolesterolemia familiare*.

L'ipercolesterolemia poligenica è una malattia ad eziologia multifattoriale, causata da fattori ambientali (dieta ad alto contenuto di grassi saturi e inattività fisica) che agiscono in presenza di fattori genetici predisponenti; probabilmente la sua causa risiede nella compromissione di meccanismi coinvolti nel compensare adeguatamente l'eccesso lipidico della dieta. Inoltre, un eccesso di colesterolo alimentare nel fegato può sopprimere la sintesi dei recettori LDL epatici e la conseguente riduzione della captazione del LDL-C circolante causa l'aumento della colesterolemia. La concentrazione di colesterolo totale è di solito compresa tra 240 e 350 mg/dl.

L'ipercolesterolemia familiare, patologia a trasmissione autosomica codominante, è molto più rara ed associata ad una mutazione del gene che codifica il recettore delle LDL. La forma eterozigote ha una incidenza di 1 caso ogni 500 individui, mentre la forma omozigote è molto più rara (1 caso ogni milione di individui). I livelli plasmatici di colesterolo totale nel sangue sono circa 275-500 mg/dL negli eterozigoti e >500 mg/dL negli omozigoti.

CAPITOLO 5

Obiettivi

5.1 ACIDI GRASSI E COLESTEROLO

Il principale approccio preventivo e curativo nel ridurre i livelli ematici del colesterolo è modificare la quota lipidica introdotta con la dieta sia in relazione alla sua quantità che alla qualità. Questo è possibile riducendo l'apporto in grassi saturi e in colesterolo e bilanciando con l'aumento in grassi poliinsaturi.

Numerosi studi hanno mostrato inoltre che dopo una dieta ricca in n-3, i livelli ematici dei due acidi grassi quali DHA e EPA aumentano significativamente, mostrando quindi che con la dieta è possibile modulare e monitorare i livelli plasmatici di questi nutrienti (Bethune C *et al* 2006).

Inoltre vari studi nella letteratura scientifica hanno proposto un ruolo determinante per i livelli ematici degli acidi grassi, come biomarkers di riferimento clinico accanto al colesterolo, comunemente usato come strumento diagnostico nelle malattie cardiovascolari.

In particolare è stato mostrato come gli acidi grassi saturi introdotti con la dieta e monitorati a livello ematico sono positivamente associati alle concentrazioni di colesterolo totale e HDL-C nel sangue, mentre i poliinsaturi sono inversamente correlati al colesterolo totale (Crowe FL *et al* 2006).

Questa evidenza ha permesso di confermare un ruolo predittivo degli acidi grassi rispetto alla colesterolemia, con l'idea di considerare il dosaggio ematico di questi nutrienti come strumenti preventivi o diagnostici soprattutto nelle malattie legate alla dieta.

Un recente lavoro scientifico condotto dal laboratorio canadese del Dott. V Pichette (Michaud J *et al* 2008), ha messo in evidenza che a livello ematico possono essere presenti dei mediatori in grado di modificare l'espressione genica. Nel dettaglio, sono stati selezionati sieri di pazienti affetti da insufficienza renale cronica e testati *in vitro* in un sistema cellulare di epatociti di ratto. L'effetto dei sieri è stato quello di ridurre l'espressione genica delle diverse isoforme del citocromo P450. Normalizzando le funzioni renali con successivo trapianto, l'effetto inibitorio del siero sull'espressione *in vitro* epatica di P450 si inverte completamente.

Lo scopo del nostro progetto pertanto è quello di poter innanzitutto identificare dei biomarkers clinici la cui concentrazione ematica sia principalmente modulabile dalla dieta e poterne individuare una loro azione diretta e significativa su specifici pathways metabolici.

In questo modo il dosaggio di particolari geni, coinvolti ad esempio nel metabolismo lipidico, quale principale target di studio nelle malattie cardiovascolari e in quelle quindi indotte da scorrette abitudini alimentari, può diventare un essenziale indice di riferimento clinico sia in condizioni preventive che terapeutiche.

CAPITOLO 6

Materiali e Metodi

6.1 LINEA CELLULARE E MEZZO DI COLTURA

La linea cellulare utilizzata è:
HepG2, cellule di epatoblastoma umano.

Il mezzo di coltura utilizzato è costituito come segue:

- EMEM (Minimum Essenzial Medium Eagle con Earle's Balanced soluzione salin, senza L-Glutamina, Biowhittaker) a cui è stato aggiunto:
- FBS (Siero fetale bovino): 10% (v/v) (Sigma)
- NEAA (Aminoacidi non essenziali): 1% (v/v) (Biowhittaker)
- Glutamina: 1% (v/v) (Biowhittaker)
- Penicillina: 100 mU/ml (Biowhittaker)
- Streptomicina: 100 µg/ml (Biowhittaker)

Le altre soluzioni necessarie per il mantenimento in coltura delle linea cellulare sono:

PBS 1X (Dulbecco's phosphate buffered saline) soluzione salina tamponata con fosfato: priva di Calcio e Magnesio, pH 7,4 contenente 137mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄.

Tripsina-EDTA: 500mg/L tripsina (1:250), 200mg/L EDTA in PBS, pH 7,4.

6.1.1 Crescita della linea cellulare eucariotica

Le cellule eucariotiche, scongelate rapidamente ad una temperatura di 37°C, vengono risospese in mezzo completo fresco e coltivate in piastre di plastica sterile per colture cellulari. Comunemente vengono mantenute in un incubatore alla temperatura di 37°C, ad una atmosfera di 5% di CO₂ e al 95% di aria ad umidità relativa del 90%.

6.1.2 Propagazione delle cellule in coltura

Dalla piastra di cellule subconfluenti si rimuove il mezzo di coltura, si lava 2 volte con PBS 1X e si aggiunge tripsina-EDTA, che lasciata agire per 5 minuti a temperatura ambiente, permette il taglio proteolitico delle proteine di adesione e le cellule quindi si staccano dalla piastra. Si aggiunge il mezzo completo che contiene fattori in grado di inibire l'effetto della tripsina, si raccolgono le cellule e si centrifuga a circa 1200 rpm per 5 minuti a temperatura ambiente. La fase successiva prevede la rimozione del

surnatante e la sospensione delle cellule in mezzo di coltura completo fresco. Si procede quindi a seminare le cellule in nuove piastre.

6.1.3 Congelamento delle cellule

Le cellule, staccate dalle piastre e centrifugate, vengono risospese in una quantità opportuna di mezzo completo a cui è stato aggiunto il 5% di DMSO (Dimetilsolfossido), agente crioprotettivo. Le cellule vengono aliquotate in tubi resistenti al processo di congelamento, congelate inizialmente a -80°C e in seguito conservate in azoto liquido.

6.2 SELEZIONE DEI SIERI

Il laboratorio di Patologia Clinica dell'ospedale Santa Maria Goretti, AUSL di Latina, ha fornito nella prima fase dello studio sessantadue sieri, ottenuti mediante consenso informato di soggetti sottoposti periodicamente a controllo clinico. L'anamnesi per ciascun soggetto, di sesso maschile e di età compresa tra i 40 ed i 50 anni, non presentava malattie in corso. Da questa prima selezione sono stati poi scelti solo quaranta sieri, escludendo quelli con parametri biomorali alterati, eccetto per il colesterolo. I livelli di colesterolo totale, HDL-C e trigliceridi sono stati dosati con l'analizzatore Architect c8000 (Abbott Laboratories, Illinois, USA); il conteggio delle cellule del sangue e il test di velocità di sedimentazione eritrocitaria sono stati effettuati con i seguenti apparecchi, XE-2100 (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) e BD SEDI-15 (Becton Dickinson, Plymouth, UK) rispettivamente.

6.3 DOSAGGIO DEGLI ACIDI GRASSI

Reagenti. Gli standards [metil esteri degli acidi linoleico (18:2 *n*-6), linolenico (18:3 *n*-3), arachidonico (20:4 *n*-6), eicosapentanoico (20:5 *n*-3), docosaesaenoico (22:6 *n*-3) e elaidinico (18:1, *trans*-9)] sono stati forniti dalla Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Transesterificazione diretta. Per il dosaggio degli acidi grassi, in 100 μl di ciascun siero umano sono stati aggiunti 50 μg di acido tridecanoico (C13:0), quale standard interno, e miscelati con una soluzione di metanolo-benzene in un rapporto volumetrico di 4:1 (v/v), utilizzando tubini in vetro. Sono stati poi aggiunti lentamente 200 μl di cloruro di acetile, sotto agitazione per circa un minuto. I tubini sono stati chiusi ermeticamente con tappi in Teflon. Dopo agitazione per circa un'ora a 100°C , la soluzione è stata raffreddata a temperatura ambiente. Una soluzione di K_2CO_3 al 6% è stata aggiunta lentamente alla soluzione sotto agitazione per arrestare la reazione e neutralizzare la mistura. I campioni sono stati poi miscelati e centrifugati e una aliquota della fase superiore di benzene per ciascun

campione è stata utilizzata per l'analisi successiva gas-cromatografica (Lepage G *et al.* 1989).

Analisi GC/MS. Il dosaggio di esteri metilici degli acidi grassi (FAME) è stato effettuato mediante tecnica gas-cromatografica (Shimadzu GC-2010), con strumentazione equipaggiata di autosampler AOC-20i, un iniettore split/splitless e un rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID). L'analisi gas-cromatografica è stata effettuata secondo le seguenti procedure convenzionali: è stata utilizzata una colonna capillare di silice fusa (SupelcowaxTM 10) (30 m x 0.32 mm id x 0.25 μ m); la temperatura è stata mantenuta a 80° C per 5 min e poi aumentata da 80 a 230°C con una rate 3.0°C/min, e lasciata a 230°C per altri 30 min; il volume di iniezione del campione è stato di 1.0 μ l, attraverso un iniettore di tipo *splitter* (17:1). Il gas carrier selezionato è stato l'elio con una velocità lineare (*u*) di 37.5 cm/sec. La temperatura del FID è stata di 280° C. Il flusso del gas per l'idrogeno era di 47.0 ml/min, 400 ml/min per l'aria, e 30 ml/min per N₂/Aria; la velocità di campionamento è stata di 40 ms. L'identificazione dei picchi cromatografici è stata ottenuta sia dal paragone dei tempi di ritenzione con standards puri sia mediante lo studio degli spettri di massa ottenuti mediante gas-cromatografica accoppiata a spettrometria di massa (GC-MS). La determinazione quantitativa è stata possibile mediante curva di calibrazione effettuata per ogni acido grasso con quattro standard a concentrazioni note differenti. Il valore finale è stato ottenuto dalla media di quattro replicati tecnici. Le deviazioni standard sono risultate essere inferiori al 10 %.

6.4 SOMMINISTRAZIONE DEI SIERI UMANI *in vitro*

Come descritto nei paragrafi precedenti, le cellule HepG2 vengono mantenute e trattate in mezzo di coltura EMEM (Eagle's minimum essential medium), arricchito da amminoacidi non essenziali, glutammina e antibiotici, quali penicillina e streptomina. Comunemente un presidio essenziale per la crescita cellulare è rappresentato dal siero fetale di origine animale. Nel nostro sistema sperimentale si riporta invece una variante, ossia l'utilizzo di sieri umani come costituenti del mezzo di coltura cellulare, al posto del siero fetale di origine animale.

In dettaglio, le cellule epatiche, con una confluenza del 70% a 24h dalla semina, vengono trattate ed incubate per 48h con il 10% di siero umano nel mezzo di coltura, ciascuno in duplicato biologico.

6.5 ESTRAZIONE RNA TOTALE E RETROTRASCRIZIONE

Dopo le 48h, viene allontanato il mezzo di coltura e effettuati due lavaggi con PBS 1X. Un opportuno volume di TriZOL (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA) come indicato da protocollo, è stato aggiunto in ogni piastra, procedendo così alla purificazione dell'RNA totale mediante estrazione con fenolo-cloroformio. Il pellet di RNA totale è stato solubilizzato in H₂O DEPC (acqua trattata con dietil-pirocobonato (Sigma)

per inibire l'azione dell'RNasi), quantificato mediante lettura spettrofotometrica a 260 nm e controllato su gel di agarosio all'1,2% (Sigma). Nel gel viene aggiunto Etidio Bromuro (0.5 µg/µL) (Sigma), agente intercalante degli acidi nucleici 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 (1U/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 utilizzando 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.

6.6 REAL TIME – PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

6.6.1 Analisi dei geni target

Gli esperimenti di Real-Time PCR sono stati condotti utilizzando la mix di reazione IQ SYBR GREEN SUPERMIX (BIO-RAD), contenente l'agente intercalante SYBR Green. Il segnale di fluorescenza, dovuto al SYBR Green, viene monitorato per quantizzare i prodotti di amplificazione specifici per ogni ciclo di PCR mediante termociclatore PTC-200 Peltier con CHROMO 4 Continuous Fluorescence Detector (BIO-RAD).

Le reazioni di amplificazione sono state effettuate con il cDNA ottenuto, 10 µL della mix di reazione contenente SYBR Green, 1 µL di ogni specifica coppia di *primer* (PRIMM, Milan, Italy), ed acqua PCR grade (BIORAD) per un volume finale di 20 µL.

Di seguito sono elencate le coppie di primer utilizzati: 18S 5'-CGATGCTCTTAGCTGAGTGT -3' e 5'-GGTCCAAGAATTTACCTCT -3'; Sterol regulatory element binding protein – 1 (Ac.No. U00968) 5'-AGATCGCGGAGCCATGGATTG -3' e 5'-CACTGACTCTTCCTTGATACC -3'; Stearoyl-CoA desaturase (Ac.No. AF097514) 5'-GCTGATCCTCATAATTCCCGA -3' e 5'-TTAAGCACACAGCATATCGC -3'; UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (Ac.No. AY435136) 5'-GATCACATGACCTTCCTGCAG -3' e 5'-CCACCATTCCATGTTCTCCAG -3'; UCP2 (NM_003355) 5'-TTGGGATTGACTGTCCACGC-3' and 5'-CCTCCAAGATCAAGCTTCTCT-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. È stata valutata la specificità della reazione analizzando la curva di melting ottenuta per ogni amplificato.

E' stato usato il metodo del $\Delta\Delta C_t$ per calcolare la quantità relativa di RNA specifici per ogni campione, confrontando i valori ottenuti nei campioni di cellule trattate con i sieri umani rispetto ai campioni di controllo con siero di origine animale. Tutti i valori ottenuti sono stati normalizzati per il gene housekeeping scelto, l'RNA ribosomale 18 S.

6.7 ANALISI STATISTICHE

I risultati ottenuti e discussi nel capitolo successivo rappresentano la media di duplicati biologici (somministrazioni *in vitro*) e triplicati tecnici (dosaggio RNA messaggero).

Le differenze statistiche sia tra i gruppi normo e ipercolesterolemici che all'interno di ciascuno di essi sono state analizzate mediante test *t* di Student. I valori di $p < 0.05$ sono stati considerati statisticamente significativi.

CAPITOLO 7

Risultati e Discussione

7.1 SELEZIONE SIERI IN BASE AI PARAMETRI BIOUMORALI

Il siero viene considerato comunemente un fondamentale mezzo di valutazione clinica, in quanto la concentrazione di ciascun suo componente può influenzare in maniera diretta sia condizioni patologiche che stati fisiologici.

In particolare, gli interventi preventivi o terapeutici nell'ambito delle malattie cardiovascolari mirano principalmente ad esaminare la quota lipidica ematica e a mantenerla nei *range* clinicamente consigliati (Warensjö E *et al* 2008; Erkkilä A *et al* 2008). Sia i livelli di colesterolo totale che quello legato a lipoproteine a bassa densità sono strettamente e positivamente correlate al rischio di malattie cardiovascolari, così agire sulla loro riduzione è ad esempio il target principale nella prevenzione dell'infarto (Lepage G *et al* 1989). L'ipercolesterolemia così come altre malattie dislipidemiche sono maggiormente associate alle abitudini alimentari, e in modo specifico alla quantità e qualità della quota lipidica introdotta con la dieta (Alwaili K *et al* 2009). La concentrazione di colesterolo non solo è importante a livello diagnostico, ma sembra essere causalmente correlata quale condizione predisponente alle malattie cardiovascolari. Per questo motivo ci è sembrato opportuno selezionare e confrontare sieri differenti in contenuto di questo sterolo, distinguendo un gruppo normocolesterolemico da quello ipercolesterolemico. Non sono state ottenute informazioni dirette sull'origine dell'ipercolesterolemia nei sieri selezionati; considerando però che i fattori genetici in questa condizione patologica sono raramente coinvolti, abbiamo essenzialmente assunto come maggiore causa di questa alterazione bioumorale le scorrette abitudini alimentari.

Da un numero iniziale di 62 campioni biologici sono stati selezionati successivamente 40 sieri. Sono stati esclusi sieri che presentavano valori di trigliceridemia e colesterolemia nella frazione HDL fuori dai *range* di riferimento clinicamente consigliati (rispettivamente > 200 e < 39). I campioni sono stati ottenuti da individui sani, soggetti ad un controllo clinico di routine ed anche non sottoposti a terapie farmacologiche; questa scelta ha permesso di escludere eventuali interferenze dovute all'azione di molecole farmaceutiche sulla regolazione genica. Inoltre per ottenere maggiore omogeneità nei gruppi di studio sono stati selezionati sieri da soggetti di sesso maschile e di età compresa tra 40 e 50 anni. Questo perché sia l'età che il sesso sono considerati variabili che possono incidere in maniera differente sia sul rischio, sullo sviluppo che sulla progressione di malattie cardiovascolari (Mercurio G *et al* 2010; Ghosh A *et al* 2010; Mozaffarian D *et al* 2007)

Il primo gruppo, caratterizzato da bassi livelli di colesterolo (media 155mg/dl), include 21 campioni sierici. Il secondo gruppo invece include 19 campioni sierici con elevata colesterolemia (media 260 mg/dl).

Nelle tabelle 2 e 3 sono mostrati l'elenco e i valori dei parametri bioumorali selezionati per ciascun siero.

Sieri	Colesterolo	HDL colesterolo	Trigliceridi	VES
10	260	65	170	/
11	296	51	177	2
18	260	71	141	/
19	261	38	114	7
22	261	55	153	/
25	275	/	85	/
29	300	53	174	/
30	276	57	193	2
34	268	60	134	16
36	268	71	73	5
37	269	61	105	/
39	304	55	207	7
40	297	33	161	54
49	267	52	151	8
51	260	59	99	/
53	265	/	89	4
56	260	/	227	/
60	283	54	172	23
61	261	39	181	3

Tabella 2. Sieri Ipercolesterolemici.

Sieri	Colesterolo	HDL colesterolo	Trigliceridi	VES
1	154	44	125	3
2	158	45	55	2
3	133	41	65	/
4	160	53	100	4
7	169	55	60	4
8	170	50	99	/
14	170	53	54	/
16	169	49	139	/
20	170	41	99	/
23	149	42	66	11
27	134	/	83	3
28	169	51	73	/
38	152	42	87	/
42	169	44	81	/
43	144	/	65	11
44	138	/	92	/
47	146	42	76	/
48	151	41	123	/
50	158	43	59	3
54	128	41	130	/
62	156	35	70	18

Tabella 3. Sieri Normocolesterolemici

7.2 PROFILO LIPIDICO

La qualità della quota lipidica nella dieta e in particolare il contenuto in acidi grassi poliinsaturi n-3 ed n-6 è un interessante oggetto di studio della letteratura scientifica, in quanto strettamente correlato al rischio e alla patogenesi delle malattie cardiovascolari (Warensjö E *et al* 2008; Erkkilä A *et al* 2008; Breslow JL *et al* 2006; Carpentier YA *et al* 2006; Li JJ *et al* 2008; Lichtenstein AH *et al* 2006; Mensink RP *et al* 2003). Pertanto numerosi gruppi di ricerca hanno approfondito differenti aspetti funzionali di questi nutrienti, studiandone gli effetti clinici e biologici (Ide T *et al* 2003; Chawla A *et al* 2001). Uno dei target attualmente in valutazione è monitorare le concentrazioni ematiche ad esempio di DHA ed EPA (Crowe FL *et al* 2006), poiché risulta essere il principale e più immediato strumento di controllo dell'apporto giornaliero di questi acidi grassi (Bethune C *et al* 2006).

Mettendo in relazione diretta i livelli sierici degli acidi grassi ed il loro *intake* nutrizionale, è inoltre possibile ottenere una riduzione significativa dei livelli di colesterolemia (Crowe FL *et al* 2008).

A tal proposito, abbiamo deciso di dosare per ciascun siero differenti specie di acidi grassi mediante tecnica gas-cromatografica e valutarne successivamente il possibile effetto *in vitro* sull'espressione genica epatica implicata in particolare nel metabolismo lipidico.

I due gruppi precedentemente distinti secondo i parametri biomorali in normocolesterolemico vs ipercolesterolemico hanno mostrato avere livelli totali in acidi grassi significativamente differenti tra loro. Infatti in prima analisi, risulta evidente che il gruppo ipercolesterolemico presenta un profilo quantitativo in grassi più abbondante.

Nonostante, come appena affermato, i livelli di acido docosaesaenoico (DHA) siano più alti nel gruppo ipercolesterolemico, la sua quota in percentuale dei poliinsaturi dosati (c18:2, c18:3, DHA, EPA, AA, C18:1trans) è maggiore nei soggetti normocolesterolemici ($p < 0.05$) (Fig. 14).

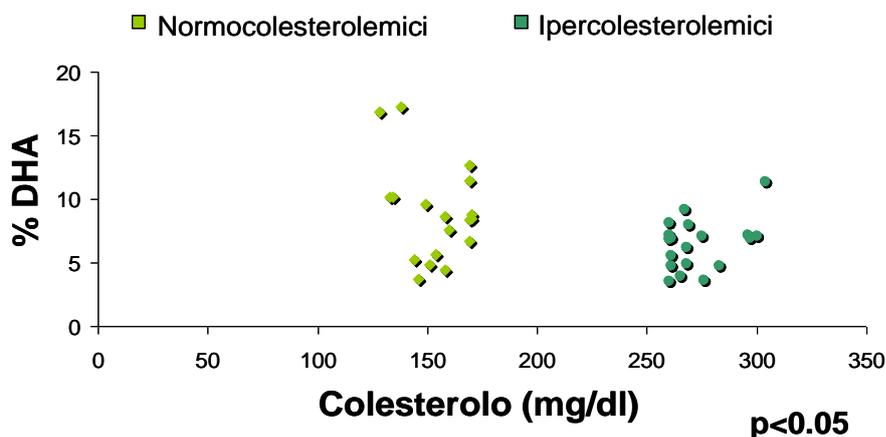


Figura 14. Colesterolo e % di DHA

In maniera simile ma con differenza più significativa rispetto al DHA, la percentuale di EPA rispetto alla somma dei PUFA dosati è significativamente più elevata nei campioni normocolesterolemici ($p < 0.01$) (Fig.15).

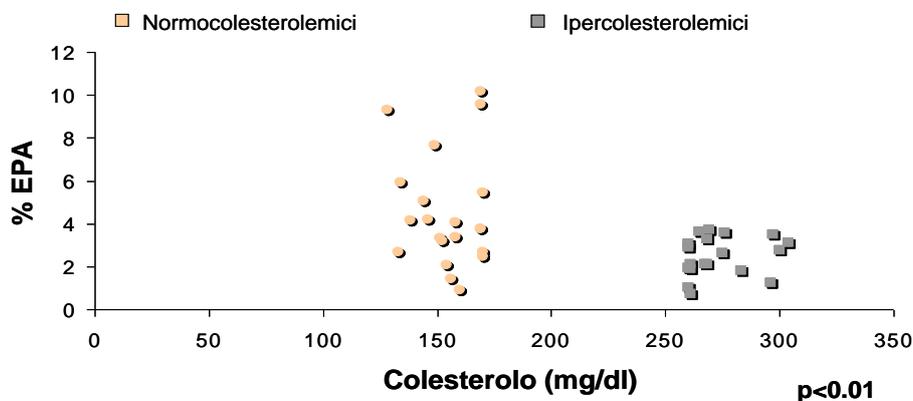
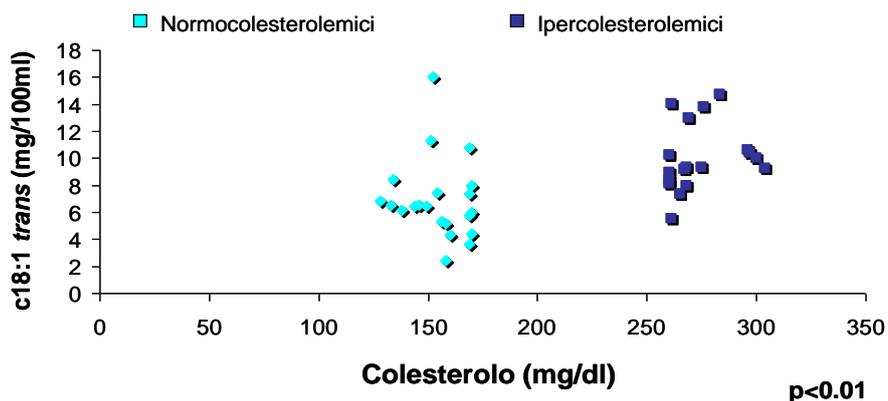


Figura 15. Colesterolo e % EPA

La nostra scelta di distinguere i due gruppi principalmente per valori di colesterolemia ha lo scopo di caratterizzare differenti comportamenti nutrizionali per ciascuno di esso, per cui livelli elevati di colesterolo possono essere la conseguenza di una scorretta alimentazione e di contro i soggetti normocolesterolemici seguono presumibilmente una dieta attenta nell'apporto lipidico. Questo dato viene ulteriormente confermato dalle nostre analisi, riscontrando infatti nei sieri ipercolesterolemici una quantità maggiore in acidi grassi *trans* (C18:1) ($p < 0.01$) (Fig. 16).

Figura 16. Colesterolo e C18:1 *trans*

È stato mostrato da numerosi studi clinici che il consumo di questi grassi, derivanti da processi di idrogenazione industriale e presenti in cibi non salubri, è associato positivamente al rischio di malattie cardiovascolari, oltre che al diabete, all'obesità e ad altre condizioni patologiche croniche (Foley JF *et al* 2008).

Il rapporto n-3/n-6 è considerato un significativo *marker* clinico influenzato dall'apporto nutrizionale degli acidi grassi poliinsaturi e un suo valore elevato è desiderabile nella riduzione del rischio di malattie cardiovascolari. In uno dei suoi studi principali nel 1991, Simopoulos *et al* ha definito l'importanza del rapporto n-6/n-3 (Simopoulos AP *et al* 1991). Negli ultimi 150 anni, il consumo di acidi grassi n-6 è drasticamente aumentato raggiungendo valori di n-6/n-3 pari a 15:1 e 20:1. Numerosi studi clinici supportano l'idea che ridurre i livelli di questo rapporto può assumere un significato protettivo nei confronti di numerose patologie degenerative (Simopoulos AP 2002; Simopoulos AP 2006).

In accordo con queste osservazioni, i nostri risultati mostrano un più alto valore del rapporto n-3/n-6 nel gruppo normocolesterolemico ($p < 0.05$) (Fig. 17).

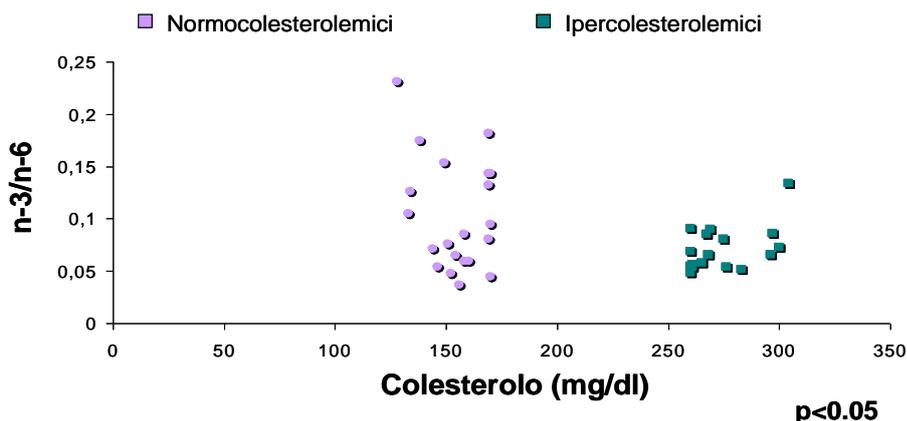


Figura 17. Colesterolo e n-3/n-6

L'acido arachidonico, uno dei maggiori rappresentanti della classe degli n-6, come già descritto in precedenza, è strettamente coinvolto nei *pathways* di sintesi di molecole pro-infiammatorie. Inoltre, studi epidemiologici, condotti su una popolazione della Nuova Zelanda hanno rilevato che livelli sierici di acidi grassi saturi e poliinsaturi rappresentano una condizione predittiva per controllare i valori di colesterolemia (Crowe FL *et al* 2008).

Le nostre indagini hanno mostrato, infatti, che i livelli di arachidonico sono marcatamente più elevati nel gruppo ipercolesterolemico ($p < 0.01$) (Fig. 18) ed è interessante notare anche che l'abbondanza di questo acido

grasso coincide con un più alto livello del suo precursore, ossia dell'acido linoleico (C18:2n-6) nei sieri ipercolesterolemici con la stessa significatività ($p < 0.01$) (Fig. 18). Questo parametro guida quindi all'identificazione di molecole, nel nostro caso derivanti dalla dieta, le cui concentrazioni ematiche possono essere potenziali indici di riferimento, accanto a quelli comunemente utilizzati, in stati infiammatori coinvolti nella patogenesi di malattie cardiovascolari.

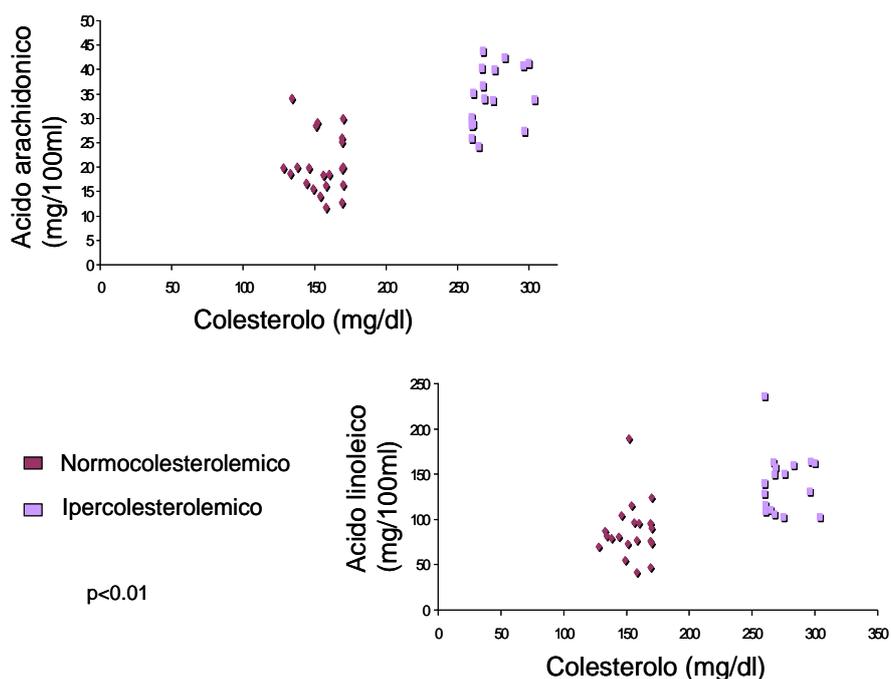


Figura 18. Colesterolo e AA (lato sinistro). Colesterolo e LNA (lato destro).

Numerosi studi scientifici hanno messo in evidenza il legame diretto tra le concentrazioni ematiche di nutrienti quali DHA e EPA e sintomi clinici ad esempio nello stato depressivo e nei disordini psichici (Conklin SM *et al* 2007); con l'intento di approfondire questa relazione tra nutrizione e stato di salute, il nostro progetto di ricerca ha quindi investigato il potenziale ruolo del dosaggio ematico di differenti acidi grassi; alla luce dei risultati ottenuti, il profilo lipidico ottenuto dall'analisi gas-cromatografica conferma e si delinea in maniera parallela ad i parametri biomorali comunemente adottati in clinica e da noi precedentemente selezionati quali colesterolemia o trigliceridemia.

Come conclusione di questa prima fase del nostro studio, il quadro lipidico ottenuto per ciascun siero è in accordo con le abitudini nutrizionali presumibili degli individui selezionati, convalidando che ad una elevata colesterolemia corrisponde un più elevato *uptake* in acidi grassi saturi (Fig. 19) ($p < 0.01$), *trans* e della serie n-6.

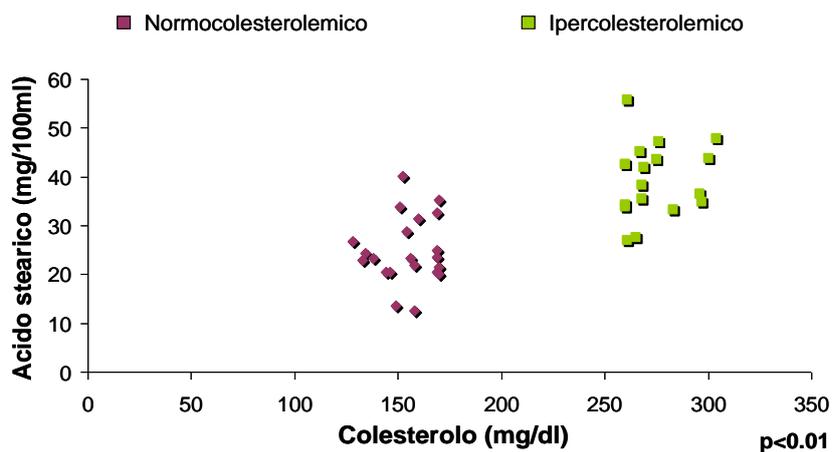


Figura 19. Colesterolo e acido stearico

7.3 MODULAZIONE GENICA

I meccanismi di regolazione genica sono complessi e si estendono a differenti livelli, dal legame di fattori trascrizionali e cofattori a regioni promotrici del DNA, alla stabilità dell'RNA messaggero, ai meccanismi di traduzione in proteine (Rollins BJ *et al* 1989).

Studi scientifici indirizzati ad approfondire meccanismi di espressione genica coinvolti nella patogenesi di diverse malattie, hanno individuato ad esempio molecole circolanti nel siero responsabili di un effetto diretto a livello genico (Poimenidi E *et al* 2009).

Questa idea ha stimolato il nostro interesse nell'esaminare l'effetto della somministrazione *in vitro* di sieri umani, opportunamente differenziati in base ad un dettagliato profilo lipidemico, sull'espressione genica epatica, essendo il fegato la principale sede metabolica del nostro organismo.

In prima analisi, i risultati ottenuti hanno dimostrato che ciascun siero è capace di indurre differentemente e in maniera significativa cambi di espressione genica nei pathways metabolici scelti.

È importante ribadire che il siero è il risultato di un complesso metabolismo sia di molecole endogene che derivanti dalla dieta e l'insieme di questi fattori potrebbero contribuire sinergicamente sulla modulazione genica. Tra i potenziali nutrienti presenti nel siero, i PUFA rappresentano attualmente il maggiore target di studio, ed essendo ormai ben noti i loro effetti clinici, ne consegue l'interesse specifico verso i loro effetti biologici, invece non del tutto chiariti. Si sviluppa quindi l'esigenza di monitorare innanzitutto i livelli ematici di questi acidi grassi poliinsaturi, controllando in tal modo il loro apporto nutrizionale, ed approfondire in seconda analisi i meccanismi molecolari soprattutto a livello genico.

L'espressione genica di SREBP-1c, UGT1A1, UCP2 e SCD è stata dosata per ciascun siero in duplicato biologico e in un sistema *in vitro* di cellule di epatoma umano (HepG2).

Dopo somministrazione *in vitro* dei campioni biologici selezionati, l'espressione genica è stata analizzata, sia per il messaggero di UGT 1A1 che di SREBP-1c, e risulta differentemente modulata dai due gruppi sierici selezionati in maniera indicativa. Invece per quel che riguarda l'espressione degli altri due messaggeri, ossia SCD e UCP2, pur osservando una netta regolazione indotta da ciascun siero, non è stato possibile dimostrare significative associazioni con i parametri lipidici selezionati. Questa mancata relazione può comunque validare un effetto specifico dei sieri ma ci induce ad analizzare altri fattori, addizionali a quelli già indagati, responsabili in maniera diretta e specifica delle modulazioni osservate.

Nel dettaglio, la modulazione genica di SREBP-1c mostra un andamento inverso rispetto ai livelli di colesterolo ($p < 0.05$) (Fig. 20).

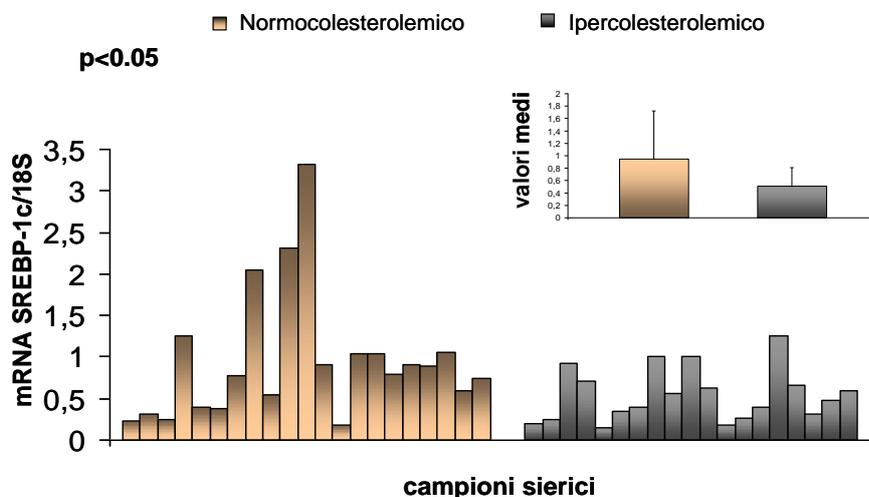


Figura 20. Modulazione genica SREBP-1c. In rosa i campioni biologici trattati con sieri normocolesterolemici. In grigio quelli trattati con sieri ipercolesterolemici.

SREBP-1c è un fattore di trascrizione, come descritto precedentemente, che regola la biosintesi dei lipidi e numerosi dati di letteratura indicano che la sua regolazione è di tipo *feedback* negativo rispetto ai valori di colesterolo endogeni. Il suo processo di maturazione nella forma attiva è infatti inibito in condizioni di diete ad alto contenuto in grassi e la sua espressione genica è inversamente correlata alle concentrazioni di colesterolo (Lin J *et al* 2005). Pertanto i risultati osservati nel nostro sistema sperimentale sottolineano una possibile down-regolazione indotta dalle concentrazioni di colesterolo sui livelli di espressione di questo gene.

Di seguito, abbiamo dosato l'espressione genica di UGT1A1, che risulta indotta in maniera significativa dai sieri ipercolesterolemici ($p < 0.01$) (Fig. 21).

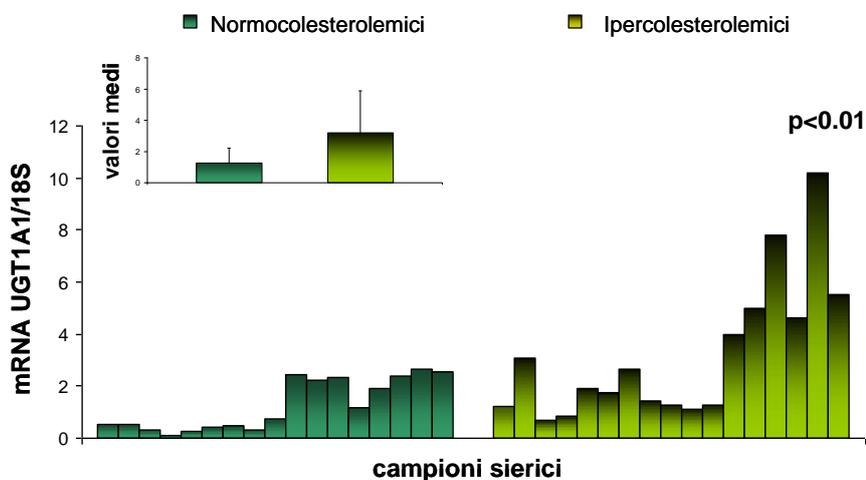


Figura 21. Modulazione genica UGT1A1. In verde scuro i campioni biologici trattati con sieri normocolesterolemici. In verde chiaro quelli trattati con sieri ipercolesterolemici.

Ad elevati livelli di arachidonico e di linoleico corrisponde una più alta espressione genica di UGT 1A1. In accordo con dati di letteratura, l'AA infatti è il substrato di UGT 1A, sia nell'isoforma 1A1 che 1B1, ed è convertito nella sua forma glucuronata per favorirne l'escrezione (Yueh MF *et al* 2007). Altri dati di letteratura mostrano inoltre che l'espressione di UGT 1A1 è indotta da molecole pro-infiammatorie, quali AA e linoleico, precursori degli eicosanoidi. Questa *up*-regolazione può mediare un meccanismo di difesa in stati pro-infiammatori e di stress ossidativo, come ad esempio nelle nostre condizioni, dove l'mRNA di questo enzima di detossificazione è influenzato positivamente da alti livelli di colesterolo (Zhang Z *et al* 2009).

La regolazione osservata nei geni selezionati può essere ricondotta al profilo lipidico da noi precedentemente indagato, sia nella frazione colesterolemica che in quella in acidi grassi. Questi risultati sulla base delle differenze significative ottenute confermano l'idea che la quota lipidica nel siero può avere un effetto diretto sulla regolazione di geni potenzialmente coinvolti sia nello sviluppo o nella progressione di condizioni patologiche alla base di disordini dislipidemici. È noto dalla letteratura che nutrienti quali DHA e EPA esplicano la loro attività biologica soprattutto a livello del metabolismo lipidico, suggerendo quindi che la loro presenza nel siero potrebbe quindi essere stata responsabile proprio dall'effetto genico osservato, senza trascurare però l'idea che il siero è un complesso di molecole e gli effetti investigati possono comunque essere il risultato sinergico di differenti costituenti.

La somma dei principali acidi grassi poliinsaturi (EPA-DHA-AA), più elevata in soggetti ipercolesterolemici ($p < 0.01$), coincide con il trend

crescente dell'espressione genica di UGT1A1 rispetto ai valori di colesterolo. La Fig. 22 mostra i valori della somma di poliinsaturi a catena lunga per ciascun siero rapportati alla modulazione del messaggero di UGT1A1.

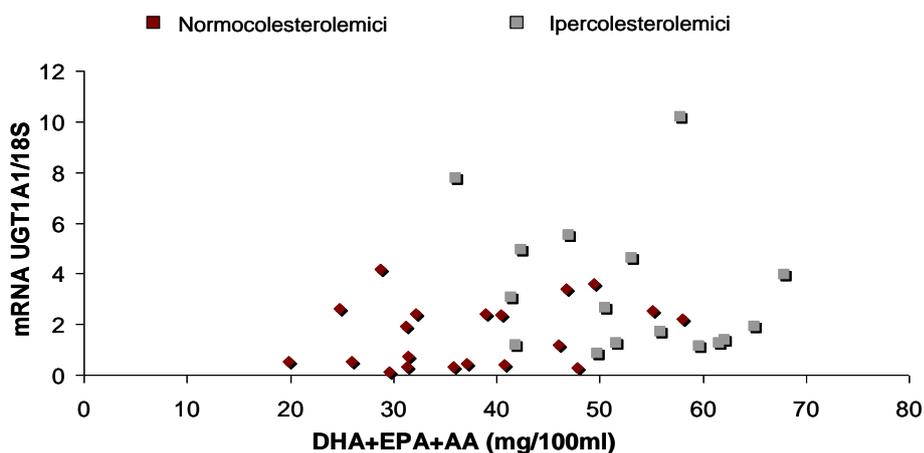


Figura 22. DHA+EPA+AA e UGT1A1.

La somma degli acidi grassi, quali C18:2, C18:3, DHA, EPA, AA, maggiore in soggetti ipercolesterolemici ($p < 0.01$), ha invece un andamento inverso rispetto ai livelli di espressione genica di SREBP-1c ($p < 0.05$). Nella Fig. 23 sono quindi riportati la somma degli n-3 e n-6 in relazione ai livelli di messaggero di questo fattore di trascrizione per ciascun campione.

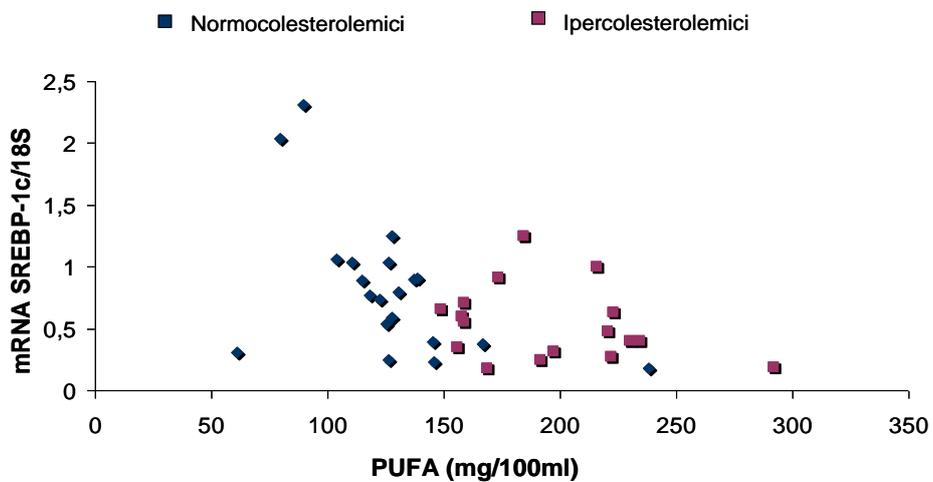


Figura 23. PUFA e SREBP-1c.

I dati ottenuti mostrano che il profilo sierico in acidi grassi e la colesterolemia sono entrambi fattori in grado di indurre un effetto funzionale sull'espressione genica, agendo in maniera specifica e selettiva sul metabolismo lipidico.

CAPITOLO 8

Conclusioni

Una corretta alimentazione ha un ruolo innanzitutto protettivo, influenzando considerevolmente e positivamente sul rischio di malattie cardiovascolari e neoplastiche.

Lo stato nutrizionale, insieme al metabolismo endogeno, è inoltre capace di modulare direttamente la composizione sierica.

Questa condizione ci ha indirizzato verso la ricerca di potenziali markers biologici, circolanti nel siero e modulabili dalla dieta, come indici predittivi o terapeutici in patologie dove lo stile alimentare può essere valutato come un fattore ambientale incisivo.

I nostri dati hanno fornito in primo luogo un profilo sierico lipidemico dettagliato, risalendo così ad informazioni presumibilmente relative alle abitudini nutrizionali dei soggetti in esame.

Le differenze di concentrazione in AA e del suo precursore, ad esempio, ottenute paragonando i due gruppi selezionati, guidano ad ipotizzare il possibile uso come *markers* clinici, soprattutto in patologie infiammatorie.

Le percentuali sieriche dosate di nutrienti come DHA e EPA, noti in letteratura essere ligandi recettoriali e modulatori dell'espressione genica, di conseguenza potrebbero aver inciso sinergicamente sugli effetti osservati nei *pathways* lipidici selezionati.

Possiamo affermare, inoltre, che sia il rapporto n-3/n-6 che in maniera inversa i livelli di acidi grassi *trans* riflettono le concentrazioni ematiche di colesterolo; un'analisi dettagliata di questi tre parametri biomorali, che hanno in comune essere sotto il controllo diretto della dieta, pertanto potrebbero fornire un quadro più approfondito nella diagnosi o nella prevenzione di disordini dislipidemici.

Sono comunque necessarie successive indagini, per individuare dettagliatamente i differenti componenti sierici responsabili delle modulazioni geniche osservate, come ad esempio nel caso dei geni analizzati SCD e UCP2; l'idea è appunto indirizzata verso il dosaggio gascromatografico di ulteriori nutrienti come ad esempio le Vitamine.

I dati descritti mettono in evidenza per la prima volta una relazione funzionale e diretta tra la composizione lipidica sierica e l'espressione di geni coinvolti nella patogenesi di malattie cardiovascolari, contribuendo potenzialmente allo sviluppo di nuove procedure diagnostiche e l'identificazione di nuovi *targets* terapeutici.

Per valutare il coinvolgimento dei numerosi fattori presenti nel siero sui meccanismi biologici sarà necessario approfondire lo studio di pathways metabolici più ampi mediante tecnica di microarray.

I risultati fino ad ora raggiunti sono il frutto di un lavoro che ha l'obiettivo generale di identificare sostanze nel sangue o nel plasma correlate a geni regolati dalla dieta ed in particolare dallo stato nutrizionale dell'individuo, in modo da definire nettamente lo stato fisio-patologico ed il rischio di malattie cardiovascolari nell'uomo.

Bibliografia

Adams TH , Walzem RL, Smith DR, Tseng S, Smith SB. Hamburger high in total, saturated and trans-fatty acids decreases HDL cholesterol and LDL particle diameter, and increases TAG, in mildly hypercholesterolaemic men. *Br J Nutr.* 2010; 103:91-8.

Alwaili K, Alrasadi K, Awan Z, Genest J. Approach to the diagnosis and management of lipoprotein disorders. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2009; 16:132-140.

Angerer P, von Schacky C. n-3 polyunsaturated fatty acids and the cardiovascular system. *Curr Opin Lipidol* 2000; 11:57-63.

Aono S, Yamada Y, Keino H, Sasaoka Y, Nakagawa T et al. A new type of defect in the gene for bilirubin uridine 5'- diphosphate-glucuronosyltransferase in a patient with Crigler-Najjar syndrome type I. *Pediatr. Res.* 1994 35:629–32.

Armstrong MB, and Towle HC. Polyunsaturated fatty acids stimulate hepatic UCP-2 expression via a PPARalpha-mediated pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 281: E1197–E1204.

Armstrong MK, Blake WL, Clarke SD. Arachidonic acid suppression of fatty acid Synthase gene expression in cultured rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 177: 1056–1061.

Aviram M, Elias K. Dietary olive oil reduces low density lipoprotein uptake by macrophages and decreases the susceptibility of the lipoprotein to undergo lipid peroxidation. *Ann Nutr Metab* 1993; 37:75-84.

Badawy IH, Atta B, Ahmed WM. Biochemical and toxicological studies on the effect of high and low erucic acid rapeseed oil on rats. *Nahrung.* 1994; 38:402-11.

Belluzzi A, Boschi S, Brignola C et al. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory bowel disease. *Am J Clin Nutr.* 2000;71(Suppl 1):339S-342S.

Belluzzi A, Brignola C, Campieri M et al. Effect of an enteric –coated fish-oil preparation on relapses in Crohn's disease. *N Engl J Med* 1996; 334:1557-1560.

Berneis KK, Krauss MM. Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. *J Lipid Res.* 2002; 43(9):1363-79.

Bethune C, Seierstad SL, Seljeflot I, Johansen O et al. Dietary intake of differently fed salmon: a preliminary study on contaminants. *Eur J Clin Invest* 2006; 36:193-201.

Bethune C, Seierstad SL, Seljeflot I, Johansen O, Arnesen H, Meltzer HM, Rosenlund G, Frøyland L, Lundebye AK. Dietary intake of differently fed salmon: a preliminary study on contaminants. *Eur J Clin Invest.* 2006 Mar;36(3):193-201.

Bonaa KH, Bjerve KS, Straume B et al. Effect of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on blood pressure in hypertension: a population-based intervention trial from the Tromsø Study. *N Engl J Med* 1990; 322:795-801.

Bosma PJ, Chowdhury JR, Bakker C, Gantla S, De Boer A et al. The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome. *N. Engl. J. Med.* 1995. 333:1171–75.

Bosner MS, Lange LG, Stenson WF, Ostlund RE Jr. Percent cholesterol absorption in normal women and men quantified with dual stable isotopic tracers and negative ion mass spectrometry. *J Lipid Res* 1999; 40: 302–8.

Bouillaud F, Ricquier D, Thibault J, and Weissenbach J. Molecular approach to thermogenesis in brown adipose tissue: cDNA cloning of the mitochondrial uncoupling protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 445–448.

Breslow JL. n-3 fatty acids and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2006; 83:1477S–1482S.

Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986; 232:34-47.

Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89 (1997) 331-40.

Burr ML, Fehily AM, Gilbert JF, Rogers S, Holliday RM, Sweetnam PM, Elwood PC, Deadman NM. Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). *Lancet.* 1989; 2(8666):757-61.

Caputo M, Zirpoli H, Torino G, Tecce MF. Selective regulation of UGT1A1 and SREBP-1c mRNA expression by docosahexaenoic, eicosapentaenoic, and arachidonic acids. *J Cell Physiol.* 2011; 226(1):187-93.

Carpentier YA, Portois L, Malaisse WJ. n-3 fatty acids and the metabolic syndrome. *Am J Clin Nutr* 2006; 83:1499S–1504S.

Chawla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf DJ. Nuclear receptors and lipid physiology: Opening the X-files. *Science* 2001; 294:1866–1870.

Chen HC. Molecular mechanisms of sterol absorptions. *J Nutr* 2001; 131: 2603–5.

Choi Y, Kim YC, Han YB, Park Y, Pariza MW, Ntambi JM. The trans-10,cis-12 isomer of conjugated linoleic acid downregulates stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *J Nutr* 2000; 130:1920–4.

Clandinin MT, Cheema S, Field CJ, Garg ML, Benkatraman J, and Clandinin TR. Dietary fat: exogenous determination of membrane structure and cell function. *FASEB J* 1991; 5:2761–2769.

Clarke DJ, Cassidy AJ, See CG, Povey S, Burchell B. Cloning of the human UGT1 gene complex in yeast artificial chromosomes: novel aspects of gene structure and subchromosomal mapping to 2q37. *Biochem. Soc. Trans.* 1997 25:S562.

Clarke SD, Armstrong MK, Jump DB. Dietary polyunsaturated fats uniquely suppress rat liver fatty acid synthase and S14 mRNA content. *J Nutr* 1990; 120: 225–231.

Collin A, Cassy S, Buyse J, Decuypere E, and Damon M. Potential involvement of mammalian and avian uncoupling proteins in the thermogenic effect of thyroid hormones. *Domest Anim Endocrinol* 2005; 29: 78–87.

Conklin SM, Manuck SB, Yao JK, Flory JD, Hibbeln JR, Muldoon MF. High omega-6 and low omega-3 fatty acids are associated with depressive symptoms and neuroticism. *Psychosom Med.* 2007; 69(9):932-4.

Crowe FL, Skeaff CM, Green TJ, Gray AR. Serum fatty acids as biomarkers of fat intake predict serum cholesterol concentrations in a population-based survey of New Zealand adolescents and adults. *Am J Clin Nutr* 2006; 83:887-894.

Crowe FL, Skeaff CM, Green TJ, Gray AR. Serum fatty acids as biomarkers of fat intake predict serum cholesterol concentrations in a population-based survey of New Zealand adolescents and adults. *Am J Clin Nutr.* 2006 Apr;83(4):887-94.

Crowe FL, Skeaff CM, Green TJ, Gray AR. Serum n-3 long-chain PUFA differ by sex and age in a population-based survey of New Zealand adolescents and adults. *Br J Nutr* 2008; 99:168-174.

Dawber TR, Meadors GP, Moore FE Jr. Epidemiological approaches to heart disease: the Framingham Study. *Am J Pub Health* 1951; 41:279-86.

Dayton S, Pearce ML, Goldman H, Harnish A, Plotkin D, Shickman M, Winfield M, Zager A, Dixon W. Controlled trial of a diet high in unsaturated fat for prevention of atherosclerotic complications. *Lancet* 1968; 2(7577):1060-2.

De La Cruz JP, Villalobos MA, Carmona JA, Martín-Romero M, Smith-Agreda JM, de la Cuesta FS. Antithrombotic potential of olive oil administration in rabbits with elevated cholesterol. *Thromb Res* 2000; 100(4):305-15.

de Roos NM, Schouten EG, Scheek LM, van Tol A, Katan MB. Replacement of dietary saturated fat with trans fat reduces serum paraoxonase activity in healthy men and women. *Metabolism*. 2002; 51(12):1534-7.

DeBose-Boyd RA, Brown MS, Li WP, Nohturjt A, Goldstein JL, Espenshade PJ. Transport-dependent proteolysis of SREBP: relocation of site-1 protease from Golgi to ER obviates the need for SREBP transport to Golgi. *Cell* 1999; 99:703-12.

Dietary fat saturation effects on low-density-lipoprotein concentrations and metabolism in various animal models. Nicolosi RJ. *Am J Clin Nutr*. 1997; 65(5 Suppl):1617S-1627S.

Dietschy JM. Theoretical considerations of what regulates lowdensity lipoprotein and high-density lipoprotein cholesterol. *Am J Clin Nutr* 1997; 65(Suppl.): 1581S–1589S.

Dreon DM Fernstrom HA, Campos H, Blanche P, Williams PT, Krauss RM. Change in dietary saturated fat intake is correlated with change in mass of large LDL particles in men. *Am J Clin Nutr* 1998; 67:828-36.

Duplus E, and Forest C. Is there a single mechanism for fatty acid regulation of gene transcription? *Biochem Pharmacol* 2002; 64: 893–901.

Dutton GJ. *Glucuronidation of Drugs and Other Compounds*. Boca Raton, FL: CRC 1980. 268.

Ebner T, Remmel RP, Burchell B. Human bilirubin UDP glucuronosyltransferase catalyzes the glucuronidation of ethinylestradiol. *Mol. Pharmacol*. 1993 43:649–54.

Echtay KS, Roussel D, St-Pierre J, Jekabsons MB, Cadenas S, Stuart JA, Harper JA, Roebuck SJ, Morrison A, Pickering S, Clapham JC, and Brand MD. Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* 2002; 415: 96–99.

Echtay KS, Winkler E, Bienengraeber M, and Klingenberg M. Site-directed mutagenesis identifies residues in uncoupling protein (UCP1) involved in three different functions. *Biochemistry* 2000;39: 3311–3317.

Edwards PA, Ericsson J. Sterols and isoprenoids: signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. *Annu. Rev. Biochem.* 68 (1999)157-85.

Edwards PA, Tabor D, Kast HR, Venkateswaran A. Regulation of gene expression by SREBP and SCAP. *Biochimica et Biophysica Acta* 2000; 1529:103-113.

Eletto D, Leone A, Bifulco M, Tecce MF. Effect of unsaturated fat intake from Mediterranean diet on rat liver mRNA expression profile: selective modulation of genes involved in lipid metabolism. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2005; 15(1):13-23.

Ericsson J, Jackson SM, Kim JB, Spiegelman BM, Edwards PA. Identification of glycerol-3-phosphate acyltransferase as an adipocyte determination and differentiation factor 1- and sterol regulatory element-binding protein-responsive gene *J Biol Chem* 1997; 272:7298-305.

Erkkilä A, de Mello VD, Risérus U, Laaksonen DE. Dietary fatty acids and cardiovascular disease: an epidemiological approach. *Prog Lipid Res* 2008; 47:172-187.

Espenshade PJ, Cheng D, Goldstein JL, Brown MS. Secreted site-1 protease cleaves peptides corresponding to luminal loop of sterol regulatory element-binding proteins. *J Biol Chem* 1999; 274:22795-804.

Falk E.. Pathogenesis of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 2006 Apr 18;47(8 Suppl):C7-12.

Fernandez ML, West KL. Mechanisms by which dietary fatty acids modulate plasma lipids. *J Nutr.* 2005; 135:2075-8.

Feskens EJ, Kronhout D. Epidemiologic studies on Eskimos and fish intake. *Ann Acad Sci* 1993; 683:9-15.

Fleury C, and Sanchis D. The mitochondrial uncoupling protein-2: current status. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; 31: 1261–1278.

Fleury C, Neverova M, Collins S, Raimbault S, Champigny O, Levi-Meyrueis C, Bouillaud F, Seldin MF, Surwit RS, Ricquier D, and Warden CH. Uncoupling protein- 2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat Genet* 1997; 15: 269–272.

Foley JF. Focus issue: mechanisms of gene regulation. *Sci Signal* 1 eg3 2008.

Gani OA, et al. Molecular recognition of Docosahexaenoic acid by peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid-X receptor alpha. *J Mol Graph Model* 2008;27:217–24.

Garlid KD, Orosz DE, Modriansky M, Vassanelli S, and Jezek P. On the mechanism of fatty acid-induced proton transport by mitochondrial uncoupling protein. *J Biol Chem* 1996;271: 2615–2620.

Gatto LM, Sullivan DR, Samman S. Postprandial effects of dietary trans fatty acids on apolipoprotein(a) and cholesteryl ester transfer. *Am J Clin Nutr.* 2003;77(5):1119-24.

Ghosh A et al. Prevalence of cardiovascular disease risk factors in people of Asian Indian origin: Age and sex variation *J Cardiovasc Dis Res.* 2010.

Glauber H, Fallace P, Driver K, et al. Adverse metabolic effect of omega-3 fatty acids in non insulin dependent diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 1988; 108:663-668.

Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 1990; 343:425-30.

Gottlicher M, Widmark E, Li Q, et al. Fatty acids activate a chimera of the clofibrate acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 4653–4657.

Grundt H, Nilsen DWT, Hetland O, et al. Improvement of serum lipids and blood pressure during intervention with n-3 fatty acids was not associated with changes in insulin levels subjects with combined hyperlipidemia. *J Intern Med* 1995; 237:249-259.

Grundy SM, Denke MA .Dietary influences on serum lipids and lipoproteins. *J Lipid Res* 1990; 31(7):1149-72.

Guan G, Dai P, Osborne TF, Kim JB, Shechter I. Multiple sequence elements are involved in the transcriptional regulation of the human squalene synthase gene. *J Biol Chem* 1997; 272:10295-302.

Han SN, Leka LS, Lichtenstein AH, Ausman LM, Schaefer EJ, Meydani SN Effect of hydrogenated and saturated, relative to polyunsaturated, fat on immune and inflammatory responses of adults with moderate hypercholesterolemia. *J Lipid Res* 2002;43(3):445-52.

Hansen GH, Niels-Christiansen LL, Immerdal L, Danielsen EM. Scavenger receptor class B type I (SR-BI) in pig enterocytes: trafficking from the brush border to lipid droplets during fat absorption. *Gut* 2003; 52: 1424–31.

Hernandez M, Montenegro J, Steiner M et al. Intestinal absorption of cholesterol is mediated by a saturable, inhibitable transporter. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1486: 232–42.

Hertz R, Magenheimer J, Berman I, et al. Fatty acyl-CoA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4alpha. *Nature* 1998; 392: 512–516.

Hodges D, Bernstein SI. Genetic and biochemical analysis of alternative RNA splicing. *Adv. Genet.* 1994 31:207–81.

Hodson L, Skeaff CM, Chisholm WA. The effect of replacing dietary saturated fat with polyunsaturated or monounsaturated fat on plasma lipids in free-living young adults. *Eur J Clin Nutr* 2001; 55:908-15.

Homan R, Krause BR. Established and emerging strategies for inhibition of cholesterol absorption. *Curr Pharm Des* 1997; 3: 29–44.

Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 2002; 109: 1125–31.

Hunter JE, Zhang J, Kris-Etherton PM. Cardiovascular disease risk of dietary stearic acid compared with trans, other saturated, and unsaturated fatty acids: a systematic review. *Am J Clin Nutr* 2010; 91:46-63.

Hwang DH. Fatty acids and immune responses, a new perspective in search for clues to mechanism. *Annu Rev Nutr* 2000; 20: 431–456.

Ide T, Shimano H, Yoshikawa T, Yahagi N et al. Cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and liver X receptor (LXR) in nutritional regulation of fatty acid metabolism. I. PPARs suppress sterol regulatory element binding protein-1c promoter through inhibition of LXR signaling. *Mol Endocrinol* 2003; 17:1240–1254.

Ide T, Shimano H, Yoshikawa T, Yahagi N et al. Cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and liver X receptor (LXR) in nutritional regulation of fatty acid metabolism. I. PPARs suppress sterol regulatory element binding protein-1c promoter through inhibition of LXR signaling. *Mol Endocrinol* 2003; 17:1240–1254.

James MJ, Cleland LG. Dietary n-3 fatty acids and therapy for rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 1997;27(2):85-97.

Jansen S, López-Miranda J, Castro P, López-Segura F, Marín C, Ordovás JM, Paz E, Jiménez-Peropérez J, Fuentes F, Pérez-Jiménez F. Low-fat and high-monounsaturated fatty acid diets decrease plasma cholesterol ester transfer protein concentrations in young, healthy, normolipidemic men. *Am J Nutr* 2000; 72(1):36-41.

Jeffcoat R. The biosynthesis of unsaturated fatty acids and its control in mammalian liver. *Essays in Biochem* 1979; 15:1–36.

Joseph JW, Koshkin V, Zhang CY, Wang J, Lowell BB, Chan CB, and Wheeler MB. Uncoupling protein 2 knockout mice have enhanced insulin secretory capacity after a high-fat diet. *Diabetes* 2002; 51: 3211–3219.

Jump DB, Clarke SD, MacDougald O, et al. Polyunsaturated fatty acids inhibit S14 gene transcription in rat liver and cultured hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 8454–8458.

Jump DB, Clarke SD. Regulation of gene expression by dietary fat. *Annu Rev Nutr* 1999; 19:63–90.

Jump DB. The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem* 2002; 277: 8755–8758.

Kaestner KH, Ntambi JM, Kelly TJ, Lane MD. Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes. A second differentially expressed gene encoding stearoyl-CoA desaturase. *J Biol Chem* 1989;264:14755–61.

Katcher HI, Hill AM, Lanford JL, Yoo JS, Kris-Etherton PM. Lifestyle approaches and dietary strategies to lower LDL-cholesterol and triglycerides and raise HDL-cholesterol. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2009 Mar;38(1):45-78.

Kavanagh K, Jones KL, Sawyer J, Kelley K, Carr JJ, Wagner JD, Rudel LL. Trans fat diet induces abdominal obesity and changes in insulin sensitivity in monkeys. *Obesity (Silver Spring)*. 2007;15(7):1675-84.

Kelly FJ. The Fast of life. The role of n-3 polyunsaturated fatty acids: relationship of cardiovascular disease. *Arch Intern Med* 2002; 161:2185-2192.

Kim YC, Ntambi JM. Regulation of stearoyl-CoA desaturase genes: role in cellular metabolism and preadipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 266:1–4.

King CD, Green MD, Rios GR, Coffman BL, Owens IS, et al. The glucuronidation of exogenous and endogenous compounds by stably expressed rat and human UDP-glucuronosyltransferase 1.1. *Arch. Biochem. Biophys.* 1996 332:92–100.

Klingenberg M, Echtay KS, Bienengraeber M, Winkler E, and Huang SG. Structure-function relationship in UCP1. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999; 23 Suppl 6: S24– S29.

Kromhout D. Serum cholesterol in cross-cultural perspective. The Seven Countries Study. *Acta Cardiol.* 1999;54(3):155-8.

Lameloise N, Muzzin P, Prentki M, and Assimacopoulos-Jeannet F. Uncoupling protein 2: a possible link between fatty acid excess and impaired glucose-induced insulin secretion? *Diabetes* 2001; 50: 803–809.

Laugharne, J. D. E et al., Fatty acids and schizophrenia. *Lipids* 1996, 31(suppl.):163-165.

Law M, Wald NJ. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment. *Lancet.* 2006;367(9509):469-70; author reply 470-1.

Lepage G, Levy E, Ronco N, Smith L et al. Direct transesterification of plasma fatty acids for the diagnosis of essential fatty acid deficiency in cystic fibrosis. *J Lipid Res* 1989; 30:1483-1490.

Li JJ, Huang CJ, Xie D. Anti-obesity effects of conjugated linoleic acid, docosahexaenoic acid, and eicosapentaenoic acid. *Mol Nutr Food Res* 2008; 52:631-645.

Li Q, Lou X, Peyronneau M-A, Straub PO, Tukey RH. Expression and functional domains of rabbit liver UDPglucuronosyltransferase 2B16 and 2B13. *J. Biol. Chem.* 1997 272:3272–79.

Lichtenstein AH, Appel LJ, Brands M, Carnethon M et al. Diet and lifestyle recommendations revision 2006: a scientific statement from the American Heart Association Nutrition Committee. *Circulation* 2006; 114:82–96.

Lichtenstein AH. Dietary trans fatty acid. *J Cardiopulm Rehabil.* 2000; 20(3):143-6.

Lin J, Yang R, Tarr PT, Wu PH, Handschin C et al. Hyperlipidemic effects of dietary saturated fats mediated through PGC-1beta coactivation of SREBP. *Cell* 2005; 120:261–273.

Lorenz R, Spengler U, Fisher S, et al. Platelet function, thromboxane formation and blood pressure control during supplementation of the western diet with cod liver oil. *Circulation* 1983; 67:504511.

Lowell BB, and Spiegelman BM. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature* 2000; 404: 652–660.

Lu K, Lee M, Patel SB. Dietary cholesterol absorption; more than just bile. *Trends Endocrinol Metab* 2001; 12: 314–20.

Mackenzie PI. Expression of chimeric cDNAs in cell culture defines a region of UDP glucuronosyltransferase involved in substrate selection. *J. Biol. Chem.* 1990 265:3432–35.

Majser P, Grimm H, Grimminger F. n-3 fatty acids in psoriasis. *Br j Nutr* 2002;87 (Suppl 1):S77-S82.

Malasanos TH, Staopole PW. Biological effects of ω -fatty acids in diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1991; 14:1160-1179.

Marchioli R, Marfisi RM, Borrelli G, Chieffo C, Franzosi MG, Levantesi G, Maggioni AP, Nicolosi GL, Scarano M, Sillelta MG, Schweiger C, Tavazzi L, Tognoni G. Efficacy of n-3 polyunsaturated fatty acids according to clinical characteristics of patients with recent myocardial infarction: insights from the GISSI-Prevenzione trial. *J of Cardiovascular Medicine*, 2007 ; 8: S34-S37.

Mata de Urquiza A, Liu S, Sjöberg M, Zetterström RH, Griffiths W, Sjövall J, Perlmann T. Docosahexaenoic Acid, a Ligand for the Retinoid X Receptor in Mouse Brain. *Science* 2000 vol.290 2140-43.

Mattiason G and Sullivan PG. The Emerging Functions of UCP2 in Health, Disease, and Therapeutics. *Antioxidants & Redox Signaling* 2006; 8: number 1-2.

Medvedev AV, Robidoux J, Bai X, Cao W, Floering LM, Daniel KW, and Collins S. Regulation of the uncoupling protein-2 gene in INS-1 beta-cells by oleic acid. *J Biol Chem* 2002; 277: 42639–42644.

Mensink RP Zock PL, Katan MB, Hornstra G. Effect of dietary fatty acids on serum lipids and lipoproteins: a meta-analysis of 27 trials. *Arterioscler Thromb* 1992; 33:1493-50.

Mensink RP, Katan MB. Effect of dietary trans fatty acids on high-density and low-density lipoprotein cholesterol levels in healthy subjects. *N Engl J Med.* 199; 323(7):439-45.

Mensink RP, Zock PL, Kester AD, Katan MB. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *Am J Clin Nutr* 2003; 77:1146–1155.

Mercuro G, Deidda M, Piras A, Dessalvi CC, Maffei S, Rosano GM. Gender determinants of cardiovascular risk factors and diseases *J Cardiovasc Med*, 2010. 11(3):207-20.

Michaud J, Nolin TD, Naud J, Dani M, Lafrance JP, Leblond FA, Himmelfarb J, Pichette V. Effect of hemodialysis on hepatic cytochrome P450 functional expression. *J Pharmacol Sci.* 2008 Oct;108(2):157-63.

Millatt LJ, Bocher V, Fruchart J, Staels B. Liver X receptors and the control of cholesterol homeostasis: potential therapeutic targets for the treatment of atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1631: 107–18.

Moghadasian MH. Experimental atherosclerosis: a historical overview. *Life Sci.* 2002;70(8):855-65.

Monaghan G, Ryan M, Seddon R, Hume R, Burchell B. Genetic variation in bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene promoter and Gilbert's syndrome. *Lancet* 1996. 347:578–81.

Mori TA, Beilin LJ. Long-chain omega-3 fatty acids, blood lipids and cardiovascular risk reduction. *Curr Opin Lipidol* 2001; 12:11-17.

Mori TA, Dunstan DW, Burke V, et al. Effect of dietary fish and exercise training on urinary F2-isoprostane excretion in non insulin dependent diabetic patients. *Metabolism* 1999; 48:1402-1408.

Mori TA, Puddey IB, Burke V, et al. Effect of ω 3 fatty acids on oxidative stress in humans: GCMS measurement of urinary F2-isoprostane excretion. *Redox Rep* 2000; 5:45-46.

Mori TA. Fish oils-dyslipidemia and glycemic control in diabetes. *Pract Diabetes Int* 1999; 16:223-226.

Mozaffarian D, Pischon T, Hankinson SE, Rifai N, Joshipura K, Willett WC, Rimm EB. Dietary intake of trans fatty acids and systemic inflammation in women. *Am J Clin Nutr*. 2004; 79(4):606-12.

Mozaffarian D, Willett WC. Trans fatty acids and cardiovascular risk: a unique cardiometabolic imprint? *Curr Atheroscler Rep* 2007; 9:486-493.

Mozaffarian, D Aro A, Willett WC. Health effects of trans-fatty acids: experimental and observational evidence. *European of Clin Nutr* 2009; 63 Suppl 2:S5-21.

Nakatani T, Tsuboyama-Kasaoka N, Takahashi M, Miura S, and Ezaki O. Mechanism for peroxisome proliferator-activated receptor- α activator-induced up-regulation of UCP2 mRNA in rodent hepatocytes. *J Biol Chem* 2002; 277: 9562–9569.

Negre-Salvayre A, Hirtz C, Carrera G, Cazenave R, Troly M, Salvayre R, Penicaud L, and Casteilla L. A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *Faseb J* 1997; 11: 809–815.

Nicholls DG, and Locke RM. Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev* 1984; 64: 1–64.

Nicholls DG. A history of UCP1. *Biochem Soc Trans* 2001; 29: 751–755.

Nielsen GL, Faarvang KL; Thomsen BS, et al. Effects of supplementation with n-3 fatty acids on clinical variables in patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Clin Invest* 1991; 22:687-69.

Nohturfft A, DeBose-Boyd RA, Scheek S, Goldstein JL, Brown MS. Sterols regulate cycling of SREBP cleavage-activating protein (SCAP) between endoplasmic reticulum and Golgi. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(20):11235-40.

Nordoy A, Bonna KH, Sandset PM, et al. Effect of omega-3 fatty acids and simvastatin risk factors and post-prandial hyperlipidemia in patients with combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasv Biol* 2000; 20:259-265.

Ntambi JM, Bene H. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. *J Mol Neurosci* 2001; 16: 273–278.

Ntambi JM. Cellular differentiation and dietary regulation of gene expression. *Prog Lipid Res* 1995; 34:139–150.

Ostlund RE. Cholesterol absorption. *Curr Opin Gastroenterol* 2002; 18: 254–8.

Ou J, Tu H, Shan B, et al. Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene by antagonizing ligand-dependent activation of the LXR. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 6027–6032.

Oubiña P, Sánchez-Muniz FJ, Ródenas S, Cuesta C. Eicosanoid production, thrombogenic ratio and serum and LDL peroxides in normo- and hypercholesterolaemic post-menopausal women consuming two oleic acid-rich diets with different content of minor components. *Br J Nutr* 2001; 85:41-7.

Owens IS, Basu NK, Banerjee R. UDP-glucuronosyltransferases: gene structures of UGT1 and UGT2 families. *Methods Enzymol.* 2005;400:1-22.

Owens IS, Ritter JK. Gene structure at the human UGT1 locus creates diversity in isozyme structure, substrate specificity, and regulation. *Prog. Nucleic Acid Res* 1995. 51:306–38.

Pawar A, Botolin D, Mangelsdorf DJ, et al. The role of liver X receptor-alpha (LXR-alpha) in the fatty acid regulation of hepatic gene expression. *J Biol Chem* 2003; 278: 40736–40743.

Pawar A, Xu J, Jerks E, et al. Fatty acid regulation of liver X receptors (LXR) and peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in HEK293 cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 39243–39250.

Peet DJ, Janowski BA, Mangelsdorf DJ. The LXRs: a new class of oxysterol receptors. *Curr.Opin. Genet. Dev.* 1998; 8:571-575.

Peet DJ, Turley SD, Ma W, Janowski BA, Lobaccaro JM, Hammer RE, Mangelsdorf DJ. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* 1998; 93:693-704.

Petrescu AD, Hertz R, Bar-Tana J, et al. Ligand specificity and conformational dependence of the hepatic nuclear factor-4alpha (HNF-4alpha). *J Biol Chem* 2002; 277: 23988–23999.

Phan CT, Tso P. Intestinal lipid absorption and transport. *Front Biosci* 2001; 6: 299–319.

Poimenidi E, Hatziapostolou M, Papadimitriou E. Serum stimulates Pleiotrophin gene expression in an AP-1-dependent manner in human endothelial and glioblastoma cells. *Anticancer Res* 2009; 29:349-354.

Poli A. Acidi grassi omega-3 e prevenzione cardiovascolare. *Trends Med* 2002; 2:129-136.

Ramirez-Tortosa C, Lopez-Pedrosa JM, Suarez A, et al. Olive oil and fish oil enriched diets modify plasma lipids and susceptibility of LDL to oxidative

modification in free-living male patients with peripheral vascular disease: the Spanish Nutrition Study. *Br J Nutr* 1999; 82:31-39.

Reilly JM, and Thompson MP. Dietary fatty acids upregulate the expression of UCP2 in 3T3-L1 preadipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 277: 541–545.

Repa JJ, Liang G, Ou J, Bashmakov Y, Lobaccaro JM, Shimomura I, et al. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev* 2000; 14:2819–30.

Risérus U, Vessby B, Arner P, Zethelius B. Supplementation with trans10cis12-conjugated linoleic acid induces hyperproinsulinaemia in obese men: close association with impaired insulin sensitivity. *Diabetologia*. 2004; 47(6):1016-9.

Ritter JK, Chen F, Sheen YY, Tran HM, Kimura S, et al. A novel complex locus UGT1 encodes human bilirubin, phenol, and other UDP-glucuronosyltransferase isozymes with identical carboxyl termini. *J. Biol. Chem.* 1992. 267:3257–61.

Roche HM, Zampelas A, Knapper JM, Webb D, Brooks C, Jackson KG, Wright JW, Gould BJ, Kafatos A, Gibney MJ, Williams CM. Effect of long term olive oil dietary intervention on postprandial triacylglycerol and Factor VII metabolism. *Am J Clin Nutr* 1998; 68:552-60.

Rogers S, James KS, Butland BK, et al. Effects of a fish oil supplement on serum lipids, blood pressure, bleeding time haemostatic and rheological variables: a double blind randomised controlled trial in healthy volunteers. *Atherosclerosis* 1987; 63:137-143.

Rollins BJ, Stiles CD. Serum-inducible genes. *Adv Cancer Res* 1989; 53:1-32.

Rustan AC, Nenaseter MS, Drevon CA. Omega-3 and Omega-6 fatty acids in the insulin resistance syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 1997, 311-326.

Sacks FM, Katan M. Randomized clinical trials on the effects of dietary fat and carbohydrate on plasma lipoproteins and cardiovascular disease. *Am J Med* 2002;113: 13Se24S.

Sakai J, Rawson RB, Espenshade PJ, Cheng D, Seegmiller AC, Goldstein JL, Brown MS. Molecular identification of the sterol-regulated luminal protease that cleaves SREBPs and controls lipid composition of animal cells. *Mol Cell* 1998; 2:505-14.

Saleh MC, Wheeler MB, and Chan CB. Uncoupling protein-2: evidence for its function as a metabolic regulator. *Diabetologia* 2002; 45: 174–187.

Sampath H, Ntambi JM. Stearoyl-coenzyme A desaturase 1, sterol regulatory element binding protein-1c and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha: independent and interactive roles in the regulation of lipid metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2006; 9:84-88.

Sehayek E, Ono JG, Shefer S et al. Biliary cholesterol excretion: a novel mechanism that regulates dietary cholesterol absorption. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 10194-9.

Seppen J, Bosma PJ, Goldhoorn BG, Bakker CT, Chowdhury JR, et al. Discrimination between Crigler-Najjar syndrome type I and II by expression of mutant bilirubin uridine diphosphateglucuronosyltransferase. *J. Clin. Invest.* 1994. 94:2385-91.

Sessler AM, Kaur N, Palta JP, Ntambi JM. Regulation of stearyl-CoA desaturase 1 mRNA stability by polyunsaturated fatty acids in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 1996; 271:29854-8.

Shimomura I, Bashmakov Y, Ikemoto S, Horton JD, Brown MS, Goldstein JL. Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96:13656-61.

Simopoulos AP. Evolutionary aspects of diet, omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. *Biomed Pharmacother* 2006; 60:5027.

Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development, *Am J Clin Nutr*, 1991 54(3):438-63.

Simopoulos AP. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother* 2002; 56:365-79.

Simopoulos Ed. 2001.v Fatty Acids and Lipids- New Findings Vol 88. A.P. Capitoli su: n-3 fatty acids in Health and Disease. Polyunsaturated fatty Acids in Behaviour, Psychiatric Diseases and Aging. Type of fatty acids in obesity and lipoprotein metabolism. Metabolism of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids.

Singh M, and Ntambi JM. Nuclear factor 1 is essential for the expression of stearyl-CoA desaturase 1 gene during preadipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1398:48-156.

Soyland E, Funk J, Rajka G et al. Dietary supplementation with very long-chain n-3 fatty acids in patients with atopic dermatitis. A double-blind, multicentre study. *Br J Dermatol* 1994; 130(6):757-764.

Stamler J, Wentworth D, Neaton JD.. Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356,222 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *JAMA.* 1986 ;256(20):2823-8.

Staopoulos PW, Alig J, Kilgore LL, et al. Lipodystrophic diabetes mellitus: investigations of lipoprotein metabolism and the effects of omega-3 fatty acid administration in two patients. *Metabolism* 1988; 37:944-951.

Storlien LH, Jenkins AB, Chishlom DJ, et al. Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats: relationship to muscle triglyceride and omega-3 fatty acids in muscle phospholipids. *Diabetes* 1991; 40:280-2289.

Strassburg CP, Nguyen N, Manns MP, Tukey RH. UDP-glucuronosyltransferase activity in human liver and colon. *Gastroenterology* 1999 116:149-60.

Strassburg CP, Oldhafer K, Manns MP, Tukey RH. Differential expression of the UGT1A locus in human liver, biliary and gastric tissue. Identification of UGT1A7 and UGT1A10 transcripts in extrahepatic tissue. *Mol. Pharmacol.* 1997 52:212-20 Stryer L. *Biochemistry*. Fourth edition 1996. Zanichelli.

Stryer L, Tymoczko JL, Berg JM. *Biochimica*. Zanichelli, 1996.

Sugatani J, Kojima H, Ueda A, Kakizaki S, Yoshinari K, Gong QH, Owens IS, Negishi M, and Sueyoshi T. The phenobarbital response enhancer module in the human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 gene and regulation by the nuclear receptor CAR. *Hepatology* 2001; 33:1232-1238.

Sugatani J, Yamakawa K, Tonda E, Nishitani S, Yoshinari K, Degawa M, Abe I, Noguchi H, Miwa M. The induction of human UDP-glucuronosyltransferase 1A1 mediated through a distal enhancer module by flavonoids and xenobiotics. *Biochemical Pharmacology* 2004; 67:989-1000.

Suzukawa M, Abbey M, Howe PCR, et al. Effects of fish oil fatty acids on low density lipoprotein size, oxidability, and uptake by macrophages. *J Lipid Res* 1995; 36:473-484.

Takahashi A, Motomura K, Kato T, Yoshikawa T, Nakagawa Y, Yahagi N, Sone H, Suzuki H, Toyoshima H, Yamada N, and Shimano H. Transgenic mice overexpressing nuclear SREBP-1c in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 2005; 54: 492-499.

Takeya Y, Popper JS, Shimizu Y, Kato H, Rhoads GG, Kagan A. Epidemiologic studies of coronary heart disease and stroke in Japanese men living in Japan, Hawaii and California: incidence of stroke in Japan and Hawaii. *Stroke*. 1984 Jan-Feb;15(1):15-23.

Tebbey PW, Buttke TM. Stearoyl-CoA desaturase gene expression in lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 186:531-6.

The multiple risk factor intervention trial (MRFIT). A national study of primary prevention of coronary heart disease. *JAMA* 1976;235:825-7.

Thiede MA, Ozols J, Strittmatter P, Tabor DE, Xia YR, Mehrabian M, Edwards PA, Lusic AJ. *Mamm Genome* 1998; 9:341–2.

Tholstrup T. Influence of stearic acid on hemostatic risk factors in humans. *Lipids* 2005; 40:1129-35.

Thompson MP, Kim D. Links between fatty acids and expression of UCP2 and UCP3 mRNAs. *FEBS Lett* 2004; 568:4-9.

Tukey RH and Strassburg CP. Human UDP-Glucuronosyltransferase: Metabolism, Expression, and Disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2000. 40:581–616.

U.S. Department of Health and Human Service and U.S. Department of Agriculture. Dietary guidelines for Americans, 2005. Washington, DC: Government Printing Office; 2005.

Undurti ND. Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology. *Biotechnol. J.* 2006, 1, 420–439.

Van Der Lee KA, Willemsen PH, Van Der Vusse GJ, and Van Bilsen M. Effects of fatty acids on uncoupling protein-2 expression in the rat heart. *FASEB J* 2000; 14: 495–502.

Wallace SK, Mozaffarian D. Trans-fatty acids and nonlipid risk factors. *Curr Atheroscler Rep.* 2009;11(6):423-33.

Warensjö E, Sundström J, Vessby B, Cederholm T, Risérus U. Markers of dietary fat quality and fatty acid desaturation as predictors of total and cardiovascular mortality: a population-based prospective study. *Am J Clin Nutr* 2008; 88:203-209.

Waters KM, Miller CW, Ntambi JM. Localization of a negative thyroid hormone-response region in hepatic stearoyl-CoA desaturase gene 1. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 233:838–43.

Waters KM, Ntambi JM. Insulin and dietary fructose induce stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression of diabetic mice. *J Biol Chem* 1994; 269:27773–7.

Waters KM, Ntambi JM. Polyunsaturated fatty acids inhibit hepatic stearoyl-CoA desaturase-1 gene in diabetic mice. *Lipids* 1996; 31(Suppl):S33–S36.

Weber P, Raederstoff D. Triglyceride-lowering effect of omega-3 LC-polyunsaturated fatty acids – a review. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2000; 10:28-37.

Weber PC. Membrane phospholipid modification by dietary ω -3 fatty acids: effects on eicosanoid formation and cell function. *Prog Clin Biol Res* 1988; 282:263-274.

Wooster R, Ebner T, Sutherland L, Clarke D, Burchell B. Drug and xenobiotic glucuronidation catalysed by cloned human liver UDP-glucuronosyltransferases stably expressed in tissue culture cell lines. *Toxicology* 1993 82:119–29.

Worgall TS, Johnson RA, Seo T, et al. Unsaturated fatty acid-mediated decreases in sterol regulatory element-mediated gene transcription are linked to cellular sphingolipid metabolism. *J Biol Chem* 2002; 277: 3878–3885.

Xie W, Yeuh M-F, Radminska-Pandye A, Saini SPS, Negishi Y, Bottroff BS, Cabrera GY, Tukey RH, and Evans RM. Control of steroid, heme and carcinogen metabolism by nuclear pregnane X receptor and constitutive androstane receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:4150–4155.

Yahagi N, Shimano H, Hastay AH, Amemiya-Kudo M, Okazaki, Tamura Y, Y. Iizuka, Shionoiri F, Ohashi K, Osuga J, Harada K, Gotoda T, Nagai R, Ishibashi S, Yamada N. A crucial role of sterol regulatory element-binding protein-1 in the regulation of lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem* 1999; 274:35840-44.

Yeuda S, Rabinovitis S, Mostosky DI., Essential fatty acids are mediators of brain biochemistry and cognitive functions. *J Neurosci Res* 1999; 56:565-570.

Yoshikawa T, Shimano H, Yahagi N, Ide T, Amemiya-Kudo M, Matsuzaka T, Nakakuki M, Tomita S, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Takahashi A, Sone H, Osuga Ji J, Gotoda T, Ishibashi S, Yamada N. Polyunsaturated fatty acids suppress sterol regulatory element-binding protein 1c promoter activity by inhibition of liver X receptor (LXR) binding to LXR response elements *J Biol Chem*. 2002 Jan 18;277(3):1705-11.

Yueh M-F, Huang Y-H, Chen S, Nguyen N, and Tukey RH. Involvement of the xenobiotic response element (XRE) in Ah-receptor mediated induction of human. UDP-glucuronosyltransferase 1A1. *J Biol Chem* 2003; 278:15001–15006.

Yueh MF, Tukey RH. Nrf2-Keap1 signaling pathway regulates human UGT1A1 expression in vitro and in transgenic UGT1 mice. *J Biol Chem* 2007; 282:8749-8758.

Zhang L, Ge L, Parimoo S, Stenn K, and Prouty SM. Human stearoyl-CoA desaturase: alternative transcripts generated from a single gene by usage of tandem polyadenylation sites. *Biochem J* 1999; 340:255–264.

Zhang Z, Wang H, Jiao R, Peng C et al. Choosing hamsters but not rats as a model for studying plasma cholesterol-lowering activity of functional foods. *Mol Nutr Food Res* 2009; 53:921-930.

Zheng Y, Prouty SM, Harmon A, Sundberg JP, Stenn KS, Parimoo S. Scd3-a novel gene of the stearyl-CoA desaturase family with restricted expression in skin. *Genomics* 2001;71:182-91.



Effetto cardioprotettivo *in acuto* degli acidi grassi poliinsaturi n-3

Progetto iniziato presso i laboratori della Columbia University, sotto la supervisione del Prof. RJ Deckelbaum e in collaborazione con il gruppo di ricerca del Prof. R Ramasamy, presso i laboratori della New York University, sempre nell'ambito del mio programma di dottorato, che ha permesso uno stage della durata di 1 anno in laboratori stranieri.

INDICE

Capitolo 1	
Introduzione	Pag 81
1.1 Dati Clinici ed Epidemiologici	Pag 82
1.2 Effetti Biologici	Pag 84
Capitolo 2	
Obiettivi del Progetto	Pag 88
Capitolo 3	
Materiali e Metodi	Pag 89
3.1 Ischemia e Riperfusione (I/R) <i>ex vivo</i>	Pag 89
3.2 Occlusione LAD <i>in vivo</i>	Pag 90
3.3 Ecocardiogramma	Pag 91
3.4 Misurazione Volume Infarto	Pag 91
3.5 LDH e CK	Pag 91
Capitolo 4	
Risultati	Pag 93
4.1 I/R <i>ex vivo</i>	Pag 93
4.1.1 LDH e CK	Pag 93
4.4 Occlusione LAD <i>in vivo</i>	Pag 93
4.4.1 Ecocardiogramma	Pag 94
4.4.2 TTC	Pag 94
4.4.3 LDH e CK	Pag 94
Capitolo 5	
Conclusione	Pag 95
Bibliografia	Pag 96

Capitolo 1**1. INTRODUZIONE**

Le correnti raccomandazioni nutrizionali sono principalmente orientate nel prevenire patologie degenerative, quali ad esempio malattie cardiovascolari e cancro. Infatti l'inibizione o la promozione dell'aterogenesi può essere influenzata da specifiche abitudini alimentari (Lichtenstein AH *et al* 2006) e in maniera simile la dieta è un fattore ambientale che può incidere in maniera diretta sia sullo sviluppo che la progressione del cancro (World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research, 2007).

In questo contesto, un forte interesse ricade sull'apporto lipidico con la dieta, sia da un punto di vista qualitativo che quantitativo. Uno degli aspetti più interessanti della ricerca sulle malattie cardiovascolari è incentrato sullo studio infatti di specifici nutrienti, quali acidi grassi poliinsaturi omega 3 (PUFA n-3) e più in particolare all'acido docosaesaenoico (DHA; 22:6 n-3), l'acido eicosapentaenoico (EPA; 20:5 n-3), e acido α linolenico (ALA; 18:3 n-3), che risultano avere uno spiccato effetto cardioprotettivo

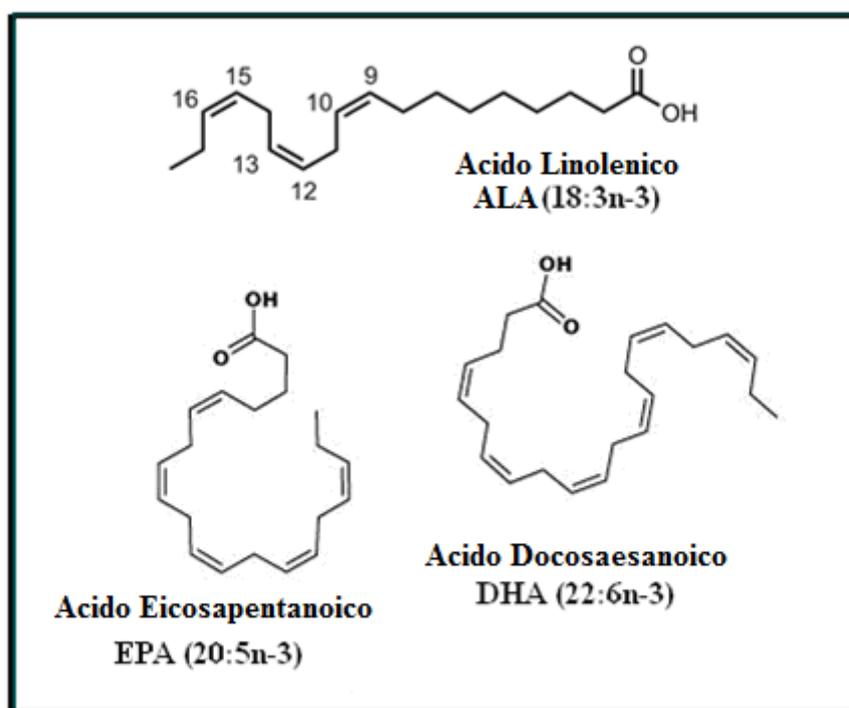


Fig. 1 Struttura chimica dei principali acidi grassi poliinsaturi omega 3 (PUFA n-3). In alto è rappresentato l'acido linolenico (ALA; 18:3n-3); nel lato sinistro in basso l'acido eicosapentaenoico (EPA; 20:5n-3); nel lato destro l'acido docosaesaenoico (DHA; 22:6n-3).

1.1 DATI CLINICI ED EPIDEMIOLOGICI

Numerosi trials clinici e meta-analisi, investigando il ruolo della quota lipidica nella dieta sia nella prevenzione primaria che in quella secondaria, hanno concluso che il consumo di una dieta ricca in PUFA n-3 riduce l'incidenza di morbilità e mortalità delle malattie cardiovascolari.

Questa ipotesi è stata innanzitutto supportata dallo studio DART (Burr ML *et al* 1989), incentrato sulla prevenzione secondaria, in cui durante il ricovero post-infarto, i pazienti sono stati sottoposti ad una dieta controllata, ricca in PUFA n-3, e si è riscontrata una riduzione di mortalità totale del 30%.

In un altro studio italiano, "GISSI Prevenzione" (GISSI-Prevenzione Investigators, 1999), l'incidenza di infarto fulminante è stata ridotta fortemente in pazienti che per 4 mesi sono stati sottoposti ad una terapia con n-3. Tuttavia nessun beneficio è stato riscontrato nell'incidenza di infarto non fatale.

Un altro studio (Svensson M *et al* 2006) ha mostrato che una supplementazione di n-3 per 2 anni non ha avuto alcun effetto sulla mortalità cardiovascolare, riducendo di contro l'incidenza dell'infarto del miocardio.

Dati riguardanti il ruolo degli n-3 nello sviluppo di coronaropatie in soggetti sani sono inconsistenti (Albert CM *et al* 1998; Guallar E *et al* 1999; Kromhout D *et al* 1996).

Un largo studio prospettico (JELIS) (Yokoyama M *et al* 2007), in pazienti ipercolesterolemici giapponesi, in assenza o con preesistenti disturbi coronarici, ha mostrato l'effetto positivo dell'EPA dopo supplemento giornaliero per lungo termine, riducendo in questo modo il rischio di malattia del 18%.

I risultati da studi preliminari (Gapinski JP *et al* 1993) riportavano che in pazienti sottoposti ad una procedura di angioplastica o impianto di stent, si aveva una riduzione di sviluppo di restenosi dopo una dieta ricca in n-3. Tuttavia i successivi studi correlati non hanno confermato lo stesso effetto positivo.

Informazioni a riguardo dell'effetto sia di supplementazione che diete ricche in n-3 sulla prevenzione primaria in ambito delle coronaropatie sono ancora inefficienti, ma le evidenze correnti suggeriscono che pazienti con iperlipidemie o diabete di base ne beneficiano maggiormente.

Nonostante le limitazioni metodologiche degli studi *in vivo*, esperimenti in animali da laboratorio hanno mostrato che una dieta ricca n-3 dopo ischemia coronarica, può predisporre ad un aumento dell'incidenza di aritmie ventricolari (Coronel R *et al* 2007). I risultati contrastanti e l'apparente assenza di effetti benefici antiaritmici di questi nutrienti, può essere spiegata dal differente meccanismo d'innescamento alle base dei diversi tipi di aritmia. Le aritmie infatti sono dovute o ad una anomala conduzione dell'impulso o ad una anomala formazione dell'impulso. L'effetto elettrofisiologico degli n-3 si esplica sia sulla riduzione della durata del potenziale di azione (Verkerk AO *et al* 2006) che sul rallentamento della conduzione dell'impulso (Dhein S *et al* 2005), agendo quindi sull'attività di innescamento e di rientro.

Secondo questa azione bivalente, i pazienti potrebbero avere sia un miglioramento che un peggioramento di aritmie ventricolari a seconda del meccanismo di innesco alla base degli eventi aritmici (Den Ruijter HM *et al* 2007).

Quindi, in pazienti con precedenti episodi di infarto miocardico, dove l'attività d'innescamento alterata è la causa dell'aritmia, gli n-3 potrebbero avere un effetto positivo nel ridurre gli eventi aritmici, mentre in quei pazienti con coronaropatie ma che non hanno mai avuto infarti, la terapia con n-3 potrebbe invece innescare episodi aritmici.

Questi dati incidono di conseguenza nella fase di scelta dei pazienti, rappresentando il parametro principale di selezione prima di iniziare una terapia con n-3.

In ulteriori studi di laboratorio, si è evidenziato un effetto anti-aritmico dei PUFA n-3 (Den Ruijter HM *et al* 2007; London B *et al* 2007), principalmente diretto sulla modulazione dei canali ionici a livello cardiaco (Xiao YF *et al* 1995).

Ad esempio, in studi di laboratorio condotti su cardiomiociti isolati descrivono che somministrazioni *in acuto* di PUFA n-3 hanno effetto inibitorio sui canali del sodio, riducendo la conduttività del potenziale di azione di circa il 50%.

Come ipotesi alternativa al meccanismo d'azione appena descritto, questi nutrienti sono capaci di incorporarsi nelle membrane cellulari, arricchendone i fosfolipidi, con conseguente aumento di fluidità e modifica dei *pathways* di segnali (Xiao YF *et al* 1998; Leifert WR *et al* 1999; Leifert WR *et al* 2000); ulteriori studi hanno mostrato inoltre che questi grassi possono avere anche effetto su altri canali ionici oltre quello del sodio, come i canali del potassio, del calcio di tipo L o sulle proteine che modulano sia il trasporto del sodio che del calcio.

Un altro meccanismo potenziale è stato riportato da differenti trials clinici, con un benefico effetto sul tono autonomo, migliorando così la contrattilità cardiaca (Mozaffarian D *et al* 2005), e diete in cronico di n-3 su topi da laboratorio hanno mostrato migliorare la funzionalità cardiaca e ridurre il volume di infarto, dopo induzione di infarto in condizioni sperimentali (Abdukeyum GG *et al* 2008).

Studi osservazionali hanno riportato che in una popolazione nativa in Giappone c'è un'incidenza inferiore di formazione di placche aterosclerotiche rispetto a Giapponesi che vivono invece in altri paesi industrializzati (Sekikawa A *et al* 2007; Sekikawa A *et al* 2008). Questo dato è principalmente attribuibile ad un elevato *intake* di n-3 nella tradizionale dieta giapponese. Infatti in una dieta giapponese la quota lipidica è più ricca in n-3 di 15 volte rispetto alle diete di altre nazioni (Iso H *et al* 2006).

Un altro interessante effetto degli n-3 è rappresentato dall'abbassamento dei livelli plasmatici dei trigliceridi, come risultato della riduzione e della sintesi epatica, ma anche per un aumento della *clearance* di quelli circolanti (Harris WS *et al* 2008; Kris-Etherton PM *et al* 2002). Per questo scopo, è consigliabile una dose di 2-4 g al giorno di PUFA n-3, che indurrebbe una riduzione di trigliceridemia di circa il 30%. Attualmente le preparazioni farmaceutiche di PUFA n-3 sono disponibili per questa indicazione terapeutica solo in alcuni Paesi.

L'ipertensione è un altro importante fattore di rischio nelle malattie cardiovascolari ed alcuni studi hanno indicato che alte dosi di n-3 sono associate ad una modesta riduzione della pressione sanguigna sistemica (Morris MC *et al* 1993). Questo effetto sembra essere più pronunciato in soggetti con ipertensione e nei soggetti più anziani (≥ 45 anni) e la dose di 3 g al giorno sembra essere sufficiente ad spiegare questo effetto (Geleijnse JM *et al* 2002). I meccanismi proposti per spiegare questo effetto includono la ridotta produzione di trombassano A2, un vasocostrittore, l'aumento di sintesi di ossido nitrico, un vasodilatatore, e il miglioramento della reattività vascolare (Mori TA *et al* 2006).

1.2 EFFETTI BIOLOGICI

L'azione anti-infiammatoria degli eicosanoidi derivanti dal pathway di sintesi degli n-3 è uno dei meccanismi alla base dell'effetto cardioprotettivo di questi nutrienti.

Di contro, gli eicosanoidi derivanti dagli n-6 hanno principalmente attività pro-infiammatoria. Prodotti dalla reazione di catalisi delle ciclossigenasi e lipossigenasi (COX e LOX), queste molecole esplicano una vasta gamma di azioni, che includono vasodilatazione, attivazione dei leucociti, stimolazione di aggregazione piastrinica e generazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS).

Gli eicosanoidi prodotti invece dal DHA e dall'EPA sono generalmente meno infiammatori di quelli derivanti dall'acido arachidonico (AA) (Lee TH *et al* 1988; Bagga D *et al* 2003), e hanno effetto vasodilatatorio e inibiscono l'aggregazione piastrinica.

Gli n-3 e AA competono per lo stesso sistema enzimatico (COX-2, LOX-5), che catalizza la formazione dei rispettivi eicosanoidi; pertanto, un alto *intake* di n-6 porta all'incorporazione di AA (vs. n-3) nei fosfolipidi di membrana e si ha preferenzialmente la formazione di derivanti da questo acido grasso (von Schacky C *et al* 1985; Wanten GJ *et al* 2007). In questo modo si sposta l'equilibrio verso un'azione pro-infiammatoria. Nonostante queste molecole pro-infiammatorie siano sia una risposta fisiologica che derivante da stimoli in stati patologici, le conseguenze ad una produzione a lungo termine di questi eicosanoidi derivanti da una dieta ricca in n-6, potrebbe contribuire a condizioni patologiche croniche quali l'aterosclerosi.

In opposizione, una soluzione a questo problema è aumentare il consumo nutrizionale di n-3 che reduce il rapporto n-6/n-3, spostando l'equilibrio verso la formazione di molecole principalmente ad azione anti-infiammatoria. Inoltre un adeguato consumo di olio di pesce reduce i livelli plasmatici di citochine infiammatorie, quali interleuchina (IL)-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α (tumor necrosis factor).

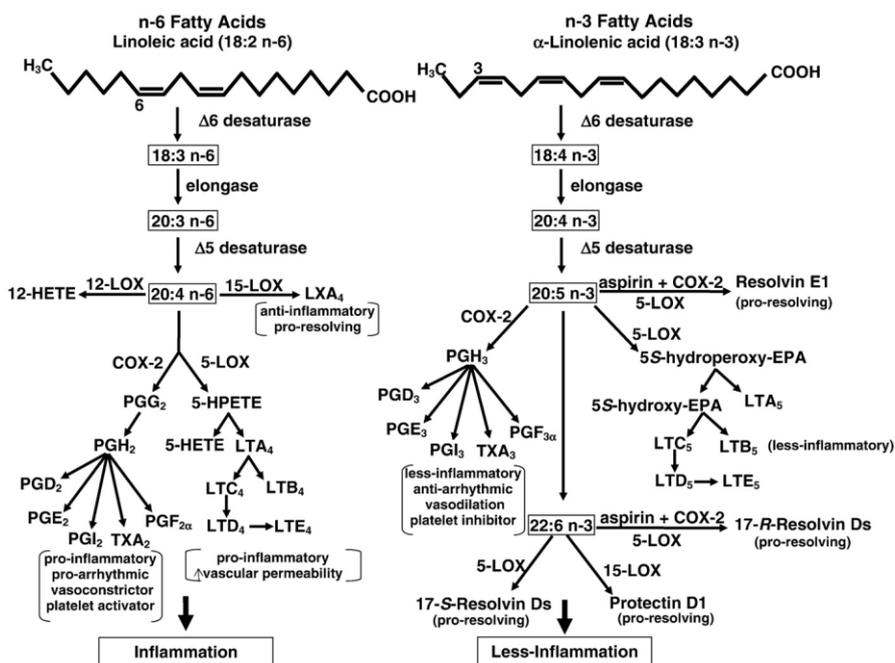


Fig. 2 Metabolismo dei PUFA della serie n-3 e n-6 e biosintesi dei corrispettivi eicosanoidi

Abbreviazioni: HPETE, acido idroperossieicosatetraenoico; LTA₄, leucotriene A₄; LXA₄, lipossina A₄.

L'attivazione del (NF)-κB, un fattore trascrizionale, gioca un ruolo chiave nella regolazione dell'espressione di geni coinvolti nella risposta infiammatoria ed è noto essere implicato in numerosi disordini correlati a cardiopatie. In questo contesto, gli n-3 sono in grado di ridurre l'espressione dei geni target regolati NF-κB, proprio tramite l'inibizione di questo fattore di trascrizione. Presi insieme questi dati, permettono di descrivere un effetto cardioprotettivo degli n-3, esplicito proprio attraverso l'inibizione della trascrizione delle citochine pro-infiammatorie, molecole di adesione e inibizione della COX-2.

Inoltre, recenti studi di metodi computazionali, hanno confermato l'interazione tra EPA e DHA con i recettori PPAR α/γ (peroxisome proliferator-activated receptor).

Il DHA è in grado infatti di favorire il legame di PPAR e RXR (retinol X receptor) (Gani OA, et al 2008). Questo suggerisce un meccanismo diretto degli n-3 nel regolare l'espressione di geni anti-infiammatori. Inoltre PUFA n-3 possono attivare PPARα, aumentando in questo modo l'espressione dei geni coinvolti nell'ossidazione degli acidi grassi con conseguente riduzione dei livelli trigliceridi sia epatici che plasmatici.

Un altro importante effetto, come già descritto, è legato alla capacità di questi nutrienti di incorporarsi nelle membrane cellulari e modularne positivamente la fluidità. (Hulbert AJ *et al* 2005; Leaf A *et al* 2005)

Un primo meccanismo diretto legato al cambio di fluidità di membrana indotto dagli n-3 è una riduzione sia di eccitabilità elettrica di membrana sia di attività dei canali di sodio voltaggio-dipendenti, effetti osservati in cardiomiociti isolati. Questo fenomeno è mediato dall'aumento della soglia di depolarizzazione richiesta per innescare il potenziale di azione, a cui segue una prolungata fase refrattaria (Kang JX *et al* 1995; Leaf A *et al* 2003). Le aritmie fatali sono causate da una mancata funzionalità dei canali del sodio e dalla variazione del calcio libero citosolico (Leaf A *et al* 2005).

Ancora, una dieta ricca in EPA + DHA può influire sulla funzionalità mitocondriale attraverso la modifica dei fosfolipidi di membrana. L'apertura dei pori di transizione di permeabilità mitocondriale (MPTP) è ritardata da EPA + DHA in cuori di ratto di controllo. Questo effetto è associato specificamente ad una riduzione delle concentrazioni di AA nella membrana ed un corrispondente aumento della quota di DHA. In contrasto, la contrattilità del ventricolo sinistro e l'apertura dei MPTP non subiscono cambiamenti dopo supplementazione con n-3 in cuori di ratti infartuati. Questi risultati evidenziano che l'inibizione dei MPTP in mitocondri cardiaci ha azione cardioprotettiva, contribuendo ad una riduzione dell'incidenza di cardiopatie in soggetti sani che consumano una dieta ricca in n-3 (O'Shea KM *et al* 2009).

In conclusione l'effetto cardioprotettivo sembra essere il risultato non di un unico meccanismo di azione ma un sinergismo di effetti multipli, coinvolgendo l'abbassamento di trigliceridi, un'attività anti-infiammatoria, la regolazione dei fattori di trascrizione e l'espressione genica, la fluidità di membrana e l'azione antiaritmica e antitrombotica. EPA e DHA hanno simili ma distinte proprietà cardioprotettive. Solo il

DHA sembra abbassare la pressione sanguigna, migliorare la contrattilità cardiaca e ridurre i livelli e le dimensioni delle particelle LDL. DHA è in grado di regolare i fattori di trascrizione con più affinità rispetto all'EPA.

n-3 PUFA effects on CVD	Mechanisms	
<i>Inhibition</i>		
Inflammation	Decrease	TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, CRP, SAA, PPAR α , PPAR γ , RXR
	Increase	Two- and four-series eicosanoids (derived from n-6 PUFA) Three- and five-series eicosanoids (derived from n-3 PUFA) Lipoxins, resolvins and protectins (derived from n-3 PUFA)
Monocyte infiltration	Decrease	MCP-1, VCAM-1, ICAM-1, E-selectin
NF- κ B activation	Decrease	Degradation of I- κ B via TLR4 activation
Platelet aggregation	Decrease	Two-series TX
	Increase	Three-series TX
Vasoconstriction	Decrease	Two-series TX
	Increase	Three-series TX
Arrhythmia	Decrease	Two-series PG Surface membrane electrical excitability Activity of voltage-dependent Na ⁺ channels Ca ²⁺ release channels and intracellular Ca ²⁺
	Increase	Three-series PG
<i>Stimulation</i>		
Proresolving mediators	Increase	Lipoxins, resolvins and protectins
Stabilization of atherosclerotic plaques	Decrease	Infiltration of monocytes into the plaques Activity of cells, that is, macrophages within the plaques
	Increase	Incorporation of n-3 PUFA into plaques Production of thick fibrous cap
TG lowering	Decrease	Apo CIII SREBP-1c activity FA substrates for lipogenesis NEFA availability
	Increase	LPL FXR PPAR α -induced oxidation Apo CII VLDL-receptor gene expression
Changes in membrane lipid composition	Decrease	Sphingomyelin content in lipid rafts Cholesterol and caveolin in caveolae
	Increase	Membrane fluidity

Table 1 Mechanisms involving the cardioprotective effect of n-3 PUFA.

Capitolo 2

2. OBIETTIVI DEL PROGETTO

Le abitudini alimentari possono avere un ruolo rilevante sia nella prevenzione che nello sviluppo delle malattie cardiovascolari e numerosi studi hanno mostrato una rilevante relazione tra l'alto consumo di acidi grassi poliinsaturi n-3 e la bassa incidenza di mortalità cardiovascolare (Dyerberg J *et al* 1979; Tamura Y *et al* 1986).

Il ruolo della nutrizione nel promuovere la salute o nel prevenire le malattie è difficile da stabilire in maniera netta, data la complessità dei numerosi nutrienti e le interazioni tra essi nella dieta (Michels KB *et al* 2005); nonostante ciò sono stati largamente documentati gli effetti benefici dell'EPA e del DHA sulle malattie cardiovascolari.

La quota di EPA e DHA assunta con la dieta ha un'azione protettiva sulla funzionalità cardiaca e riduce l'incidenza e le complicanze dei disturbi cardiovascolari (Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico 1999; Burr ML 1992).

Una delle ipotesi per spiegare l'effetto positivo sul cuore di questi nutrienti è la incorporazione nei fosfolipidi di membrana con conseguente azione diretta sui canali ionici a voltaggio dipendente (Pound EM *et al* 2001), accompagnato anche dalla modifica dell'omeostasi del calcio intracellulare (Jude S *et al* 2006).

In alcune situazioni cliniche acute, quale può essere l'infarto del miocardio, potrebbe essere vantaggioso intervenire con la somministrazione di n-3 e modificare rapidamente il loro contenuto di membrana; questo può non essere possibile mediante somministrazione orale, in quanto una dieta ricca in olio di pesce necessita di tempi di circa 2 settimane prima di ottenere un cambiamento della composizione di membrana (Demaison L *et al* 2002). In un recente studio su un numero limitato di pazienti, Schrepf *et al* ha mostrato che somministrazioni endovenose di emulsione lipidica ricca in n-3 ha avuto un ruolo protettivo sulle aritmie severe cardiache (Schrepf R *et al* 2004).

L'obiettivo di questo studio è investigare se l'iniezione intraperitoneale *in acuto* di PUFA n-3 possa migliorare l'abilità del cuore di recuperare la sua funzionalità dopo un episodio ischemico, in modelli sperimentali *in ex vivo* di cuori isolati (utilizzando il sistema di Langendorff) e *in vivo* mediante l'occlusione della arteria coronarica sinistra discendente (LAD).

Capitolo 3

3. MATERIALI E METODI

Tutti gli esperimenti in vivo sono stati eseguiti nel rispetto delle norme guida della "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" della Columbia University.

I topi Wilt type C57BL6 sono stati adottati come modello sperimentale.

3.1 ISCHEMIA E RIPERFUSIONE (I/R) *ex vivo*

I topi Wilt type C57BL6 (300–400 g) sono anestetizzati con ketamine/xylazine [80 mg/kg e 10 mg/kg; con iniezione intraperitoneale (IP)]. I cuori rapidamente incisi, sono trasferiti in soluzione salina in ghiaccio. Individuata l'aorta entro un tempo massimo di tre minuti, il cuore viene inserito in un apparato di perfusione, sistema di Langendorff, e viene perfuso con il seguente buffer (in mM): 118 NaCl, 4.7 KCl, 2.5 CaCl₂, 1.2 MgCl₂, 25 NaHCO₃, 5 glucosio, 0.4 palmitato, 0.4 BSA, e 70 mU/l insulina. Nei cuori isolati trattati, il buffer di perfusione viene modificato dall'aggiunta di un'emulsione lipidica ricca in PUFA n-3 e somministrato *in acuto* solo durante i 60 min di riperfusione.

La pressione sistolica del ventricolo sinistro (LVDP) and e quella diastolica (EDP) sono continuamente monitorate. Il cuore batte con una velocità di 420battiti/min e usando un palloncino in lattice inserito nel ventricolo sinistro il cuore viene connesso ad un trasduttore di pressione. La funzionalità cardiaca viene registrata da "4-channel ADI recorder".

Lo schema sperimentale prevede un periodo di stabilizzazione di circa 30 min in condizioni di ossigeno standard, il cuore viene sottoposto poi ad ischemia globale per 30 min con blocco totale della perfusione del buffer, a cui segue la riperfusione di 60 min nuovamente con perfusione del buffer e ossigeno in condizioni basali. Il cuore è soggetto ad una velocità di flusso di 2.5 ml/min.

La temperatura dell'apparato di riperfusione è finemente controllata da un bagnetto termostato, mantenendo una temperatura di $40 \pm 0.2^\circ\text{C}$ durante il periodo iniziale di 30 min e la successiva ora di riperfusione. La temperatura viene abbassata a $37 \pm 0.2^\circ\text{C}$ durante l'ischemia globale. L'ossigenazione dell'apparato viene mantenuta ad una pressione di $\text{Po}_2 > 600 \text{ mmHg}$.

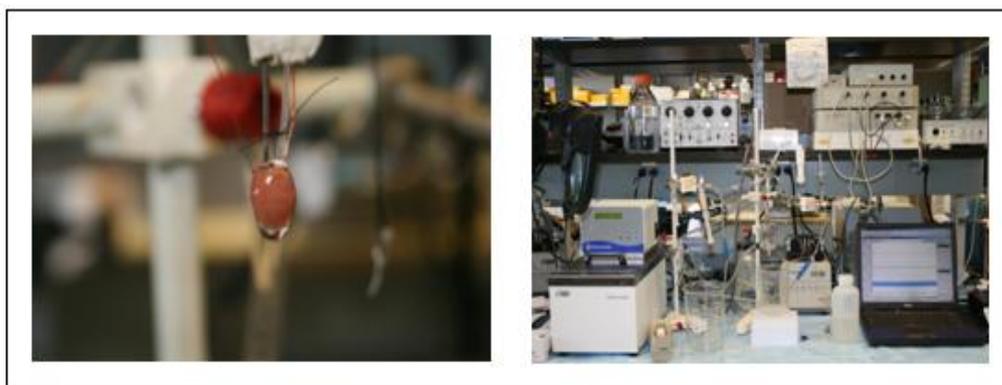


Fig. 3 rappresentazione del sistema di Langendorff. Sul lato sinistro, il cuore isolato con il palloncino inserito nel ventricolo sinistro. Sul lato destro l'apparato di Riperfusione completo.

3.2 OCCLUSIONE DELL'ARTERIA CORONARICA SINISTRA DISCENDENTE (LAD) *in vivo*.

Il topo, in posizione supina, è intubato e ventilato con una cannula di plastica della grandezza di 20-gauge, collegata ad un sistema miniventilator (Harvard Apparatus, Holliston, MA).

La procedura chirurgica viene eseguita con microscopio Leica 8x. Dopo aver rimosso il pelo, viene effettuata un'incisione in corrispondenza del muscolo sinistro pettorale maggiore, e attraverso due micro-retrattori le estremità destra e sinistra vengono distese, facilitando l'operazione chirurgica. Lo spazio sottostante alla terza costola viene reso visibile e delicatamente viene tagliata la giunzione con lo sterno costale di circa 3 mm, evitando accuratamente un danno all'arteria sinistra interna mammaria.

Il pericardio viene tagliato ed il cuore immobilizzato in modo da visualizzare l'arteria coronarica sinistra discendente (LAD). Un filo di sutura 8/0 (Sharpoint) viene fatto passare sotto la LAD ad 1 mm circa dall'appendice dell'atrio sinistro, immediatamente dopo la biforcazione dell'arteria coronarica maggiore sinistra. Una piccola cannula di plastica sterile di 20-gauge viene posizionata sotto il filo di sutura per fissare il nodo e la LAD viene occlusa per 30 min.

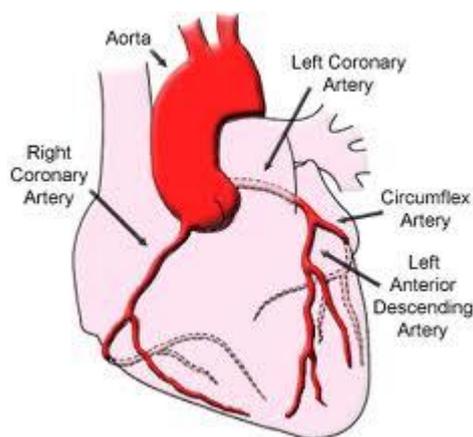


Fig. 3 Rappresentazione LAD

Dopo 30 min di ischemia locale, il filo di sutura viene rimosso e il flusso sanguigno della LAD viene ripristinato. Immediatamente dopo, viene effettuata un'iniezione intraperitoneale di un'emulsione lipidica di n-3. La seconda iniezione viene effettuata dopo i successivi 60 min di riperfusione. Gli animali di controllo sono soggetti alla stessa procedura chirurgica, ma l'emulsione di n-3 viene sostituita da un eguale volume di soluzione salina, seguendo gli stessi tempi sperimentali prima descritti. La parete della gabbia toracica viene chiusa in prossimità della terza e quarta costola e la pelle è suturata con fili di seta di 5/0. Il muscolo sinistro pettorale maggiore viene risistemato nella posizione originaria e la ventilazione assistita viene gentilmente rimossa, aspettando il ripristino spontaneo della respirazione. La

procedura chirurgica viene eseguita normalmente in circa 15-20 min. I cuori sono poi sottoposti alle analisi richieste dopo 48h di riperfusione.

3.3 ECOCARDIOGRAMMA

Dopo 48h di riperfusione, viene eseguita la misurazione ecocardiografica.

Brevemente, i topi vengono anestetizzati con isoflurano (1.5%) e sottoposti ad ecocardiogramma bidimensionale, per valutarne la funzionalità cardiaca, usando un apparato ultrasuono PHILIPS 5500 (Philips Medical, Andover, MA) con trasduttore 15-MHz. Le immagini bidimensionali ecocardiografiche sono ottenute e registrate in formato digitale. Le dimensioni diastoliche del ventricolo sinistro (LVDd) e quelle sistoliche (LVDs) vengono registrate e misurate. La percentuale della forza di contrattura (FS) viene calcolata con la seguente formula: $\% FS = \frac{LVDs}{LVDd} \times 100$.

3.4 MISURAZIONE DEL VOLUME DI INFARTO

Lo *staining* con Cloruro di Trifeniltetrazolio (TTC) è eseguito per misurare l'area necrotizzata del cuore infartuato, dopo protocollo sperimentale di occlusione della LAD *in vivo*.

Dopo aver sacrificato il topo e espantato il cuore, viene iniettata una soluzione all'1% di TTC (diluito in un buffer 0.1 M Tris, pH 7.8) attraverso l'aorta con una siringa 20-gauge. Il cuore isolato è mantenuto in soluzione di TTC per 20 min a 37°C.

Il cuore isolato viene poi diviso approssimativamente in 5-6 sezioni trasversali, pesate individualmente. La colorazione con TTC viene fissata in paraformaldeide al 4% per 30 min. il tessuto viene poi fotografato con opportuna illuminazione in modo da rendere visibile ciascun area interessata. Il rapporto tra l'area necrotica e quella vitale viene poi misurata mediante software Image Analysis.

Il TTC, una soluzione di colore blu, reagisce con l'enzima deidrogenasi in presenza del NADH, con formazione del pigmento formazone solo in cellule vitali, che si colorano di rosso. L'area infartuata invece, in mancanza dell'enzima attivo, rimane colorata di blu dalla soluzione iniziale di TTC.

3.5 MISURA DELLA LATTATO DEIDROGENASI (LDH) E DELLA CREATINA CHINASI (CK)

Il danno ischemico viene valutato mediante il dosaggio del rilascio di lattato deidrogenasi (LDH) e creatina chinasi (CK) dall'effluente coronarico del cuore perfuso nel sistema *in vivo* I/R e dal prelievo di sangue da topi soggetti ad occlusione della LAD, usando kit enzimatici clinici commerciali.

LDH catalizza la reazione di ossidazione del lattato in piruvato, con simultanea riduzione del NAD a NADH. È un saggio colorimetrico e l'attività di LDH è proporzionale all'aumento di assorbanza dovuta alla riduzione di NAD.

La misura di CK è basata sulla conversione di ADP in ATP. La prima produzione di ATP è consumata nella formazione del glucosio 6 fosfato, substrato

dell'enzima glucose-6-fosfato deidrogenasi, con produzione di NADH da NAD⁺. La produzione di NADH è monitorata dal cambio di assorbanza a 340 nm.

Capitolo 4

4. RISULTATI

Lo scopo del progetto è di studiare ed approfondire il possibile uso farmacologico degli acidi grassi a catena lunga della serie n-3 negli nell'infarto del miocardio, utilizzando sistemi in *ex vivo* (I/R) e in modelli *in vivo* di occlusione della LAD.

Sono stati, in primo luogo, testati e validati tecnicamente i due modelli sperimentali secondo i protocolli selezionati, verificandone la riproducibilità e la ripetibilità.

4.1 I/R *ex vivo*

I dati sulla funzionalità cardiaca sono stati ottenuti paragonando la forza meccanica del cuore durante i 30 min di stabilizzazione e i 60 min di ri-perfusione per ciascun cuore isolato.

I primi esperimenti effettuati mostrano che la somministrazione *in acuto* di emulsioni lipidiche di PUFA n-3 sembrano migliorare il ricovero funzionale del cuore dopo ischemia globale, contrariamente la LVDP è consistentemente più ridotta nei cuori di controllo perfusi con il buffer standard di ri-perfusione.

4.1.1 LDH e CK

Il rilascio di LDH e CK viene misurato dall'analisi spettrofotometrica dell'eluato di perfusione, raccolto durante i 60 min post-ischemici.

La misura di LDH sembra non avere valori differenti tra il cuore trattato con n-3 rispetto a quello di controllo. Diversamente, emerge da una prima analisi che i valori di CK sono marcatamente più bassi nei cuori trattati con i PUFA n-3 rispetto al controllo.

4.2 OCCLUSIONE LAD *in vivo*

Per investigare l'effetto in acuto della somministrazione di PUFA n-3 dopo danno ischemico del miocardio, i topi WT sono stati sottoposti a 30 min di ischemia locale, indotta da occlusione dell'arteria coronarica discendente sinistra; dopo aver ripristinato il flusso sanguigno coronarico viene iniettata la prima dose di emulsione lipidica di PUFA; trascorsi 60 min, viene effettuata la seconda iniezione intraperitoneale; infine a 48h dall'ischemia viene valutato il recupero della funzionalità cardiaca paragonando i topi trattati con l'emulsione di n-3 rispetto ad i topi di controllo, trattati con corrispondente volume di soluzione salina.

4.2.1 ECOCARDIOGRAMMA

L'ecocardiogramma eseguito dopo 48h ha rilevato un'incoraggiante differenza in topi che hanno ricevuto l'iniezione intraperitoneale di n-3 rispetto ai topi di controllo. La forza di contrazione è infatti maggiore nei topi trattati.

Questi dati preliminari suggeriscono un incoraggiante effetto in acuto della somministrazione di PUFA n-3, in quanto l'emulsione lipidica in esame protegge in maniera rilevante dal danno ischemico locale indotto dall'occlusione dell'arteria coronarica.

4.2.2 MISURAZIONE DEL VOLUME D'INFARTO

Il volume dell'infarto è stato misurato mediante saggio di staining con TTC. Paragonando il gruppo trattato con n-3 rispetto al controllo, si è riscontrata una riduzione marcata del volume di infarto nei cuori trattati con l'emulsione lipidica.

4.2.3 LDH e CK

I livelli plasmatici di CK e LDH, come markers del danno ischemico, sono valutati a 48h di Riperfusione. Il rilascio di LDH sembra essere più elevato nei topi di controllo rispetto al gruppo trattato con i PUFA n-3.

Tuttavia i livelli plasmatici di CK non sono attenuati dal trattamento con gli acidi grassi rispetto al controllo.

Capitolo 5

5. COCLUSIONI

Le patologie cardiache sono il risultato di eziologie multiple. Le raccomandazioni nutrizionali proposte possono rallentare la progressione di cardiopatie con azione prevalentemente preventiva.

Numerosi studi clinici suggeriscono che un alto *intake* di PUFA n-3, i principali acidi grassi contenuti nell'olio di pesce, può abbassare l'incidenza di malattie cardiovascolari e somministrazioni con dosi farmaceutiche di questi nutrienti riducono eventi ischemici recidivi in pazienti cardiopatici.

Come descritto precedentemente, i meccanismi investigati alla base degli effetti benefici di questi grassi poliinsaturi, sono complessi e non del tutto chiariti. Dati di letteratura hanno ampiamente confermato che supplementazioni con n-3 abbassano i livelli di trigliceridemia e ancora più recentemente è stato dimostrato che questi acidi grassi hanno azione anti-infiammatoria, interferendo con la sintesi di eicosanoidi e citochine ad attività pro-infiammatoria.

In studi *in vivo*, l'olio di pesce modula favorevolmente la funzionalità mitocondriale cardiaca. Le attività biologiche degli n-3 fin'ora investigate contribuiscono marcatamente nel moderare lo sviluppo o la progressione di cardiopatie. La maggior parte dei dati indagati tuttavia provengono da studi di alimentazione controllata in cronico, sia con attività preventiva sia come strategia terapeutica dopo evento ischemico.

In questo contesto, il nostro progetto indaga l'effetto della somministrazione di emulsioni di n-3 *in acuto* successivamente al danno ischemico indotto. Si è deciso di adottare due tipi di sistemi sperimentali, il primo *in ex vivo* mediante il sistema di Langendorff, e il secondo *in vivo* tramite l'occlusione dell'arteria coronarica discendente sinistra.

Questi risultati preliminari mostrano un chiaro miglioramento della contrattilità cardiaca dopo danno ischemico indotto, in topi e in cuori isolati trattati con PUFA n-3, rispetto al controllo.

Tuttavia questi dati iniziali necessitano di successive convalide sperimentali per poter stabilire una differenza statisticamente significativa tra in due gruppi a confronto.

Una volta confermati statisticamente i dati appena descritti, gli obiettivi futuri di questo progetto sono pertanto quelli di investigare un putativo meccanismo sotteso all'effetto cardioprotettivo degli n-3, con particolare attenzione rivolta a livello mitocondriale, sull'omeostasi del calcio cellulare e nella regolazione genica.

BIBLIOGRAFIA

Abdukeyum GG, et al. Dietary (n-3) long-chain polyunsaturated fatty acids inhibit ischemia and reperfusion arrhythmias and infarction in rat heart not enhanced by ischemic preconditioning. *J Nutr* 2008; 138: 1902–09.

Albert CM, et al. Fish consumption and risk of sudden cardiac death. *JAMA* 1998; 279: 23–28.

Bagga D, et al. Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100: 1751–6.

Brouwer IA, et al. Effect of fish oil on ventricular tachyarrhythmia in three studies in patients with implantable cardioverter defibrillation: a randomized controlled trial. *JAMA* 2005; 293:2884-91.

Burr ML et al. Lack of benefit of dietary advice to men with angina: results of a controlled trial. *Eur J Clin Nutr* 2003; 57:193-200.

Burr ML, et al. Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). *Lancet* 1989; 344: 757–61.

Burr ML. Fish food, fish oil and cardiovascular disease. *Clin Exp Hypertens* 1992, A14: 181-192.

Coronel R, et al. Dietary n-3 fatty acids promote arrhythmias during acute regional myocardial ischemia in isolated pig hearts. *Cardiovasc Res* 2007; 73: 386–94.

Demaison L, et al. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and coronary heart disease-related mortality: a possible mechanism of action. *Cell Mol Life Sci* 2002, 59: 463-477.

Den Ruijter HM, et al. Pro- and antiarrhythmic properties of a diet rich in fish oil. *Cardiovasc Res* 2007; 73: 316–25.

Dhein S, Michaelis B, Mohr FW. Antiarrhythmic anelectrophysiological effects of long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2005; 371: 202–11.

Dyerberg J, et al. Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis? *Lancet* 1978, 2: 117-119.

Gani OA, et al. Molecular recognition of Docosahexaenoic acid by peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid-X receptor alpha. *J Mol Graph Model* 2008;27:217–24.

Gapinski JP, et al. Preventing restenosis with fish oils following coronary angioplasty. A meta-analysis. *Arch Intern Med* 1993; 153: 1595–601.

Geleijnse JM, et al. Blood pressure response to fish oil supplementation: meta regression analysis of randomized trials. *J Hypertens* 2002; 20: 1493–99.

GISSI-Prevenzione Investigators (Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico). Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. *Lancet* 1999; 354: 447–55.

Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico. Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. *Lancet* 1999,354: 447-455.

Guallar E, et al. Omega-3 fatty acids in adipose tissue and risk of myocardial infarction: the EURAMIC study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1111–118.

Harris WS, et al. Omega-3 fatty acids and coronary heart disease risk: clinical and mechanistic perspectives. *Atherosclerosis* 2008; 197: 12–24.

Hulbert AJ, et al. Dietary fats and membrane function: implications for metabolism and disease. *Biol Rev Camb Philos Soc* 2005;80: 155–69.

Iso H, et al, for the JPHC Study Group. Intake of fish and n3 fatty acids and risk of coronary heart disease among Japanese: the Japan Public Health Center-Based (JPHC) Study Cohort I. *Circulation* 2006; 113: 195–202.

Jude S, et al. Dietary long-chain omega-3 fatty acids of marine origin: A comparison of their protective effects on coronary heart disease and breast cancers. *Prog Biophys Mol Biol* 2006, 90: 299-325.

Kang JX, et al. Free, long-chain, polyunsaturated fatty acids reduce membrane electrical excitability in neonatal rat cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:3997–4001.

Kris-Etherton PM, et al, for the Nutrition Committee. AHA scientific statement—fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation* 2002; 106: 2747–57.

Kromhout D, et al. Alcohol, fish, fibre and antioxidant vitamins intake do not explain population differences in coronary heart disease mortality. *Int J Epidemiol* 1996; 25: 753–59.

Leaf A, et al. Clinical prevention of sudden cardiac death by n-3 polyunsaturated fatty acids and mechanism of prevention of arrhythmias by n-3 fish oils. *Circulation* 2003;107:2646–52.

Leaf A, et al. Membrane effects of the n-3 fish oil fatty acids, which prevent fatal ventricular arrhythmias. *J Membr Biol* 2005;206:129–39.

Lee TH, et al. Characterization of leukotriene B3: comparison of its biological activities with leukotriene B4 and leukotriene B5 in complement receptor enhancement, lysozyme release and chemotaxis of human neutrophils. *Clin Sci (Lond)* 1988;74:467–75.

Leifert WR, et al. Inhibition of cardiac sodium currents in adult rat myocytes by n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Physiol* 1999; 520: 671–79.

Leifert WR, et al. Membrane fluidity changes are associated with the antiarrhythmic effects of docosahexaenoic acid in adult rat cardiomyocytes. *J Nutr Biochem* 2000; 11: 38–44.

Lichtenstein AH et al. diet and lifestyle recommendations revision 2006: a scientific statement from the American Heart Association Nutrition Committee. *Circulation* 2006, 114:82-96.

London B, et al. Omega-3 fatty acids and cardiac arrhythmias: prior studies and recommendations for future research: a report from the National Heart, Lung, and Blood Institute and Office Of Dietary Supplements Omega-3 Fatty Acids and their Role in Cardiac Arrhythmogenesis Workshop. *Circulation* 2007; 116: e320–35.

Michels KB et al. Can dietary patterns help us detect diet-disease associations? *Nutr Res Rev* 2005, 18: 241-248.

Mori TA, et al. The independent effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on cardiovascular risk factors in humans. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2006; 9: 95–104.

Morris MC, et al. Does fish oil lower blood pressure? A meta-analysis of controlled trials. *Circulation* 1993; 88: 523–33.

Mozaffarian D, et al. Effect of fish oil on heart rate in humans: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Circulation* 2005; 112: 1945–52.

O'Shea KM et al. Dietary n-3 fatty acids alter cardiac mitochondrial phospholipid composition and delay Ca²⁺-induced permeability transition. *J Mol Cell Cardiol.* 2009; 47(6):819-27.

Pound EM, et al. Partitioning of polyunsaturated fatty acids, which prevent cardiac arrhythmias, into phospholipid cell membranes. *J Lipid Res* 2001, 42: 346-351.

Schrepf R, et al. Immediate effects of n-3 fatty acid infusion on the induction of sustained ventricular tachycardia. *Lancet* 2004, 363: 1441-1442.

Sekikawa A, et al. Less subclinical atherosclerosis in Japanese men in Japan than in White men in the United States in the post-World War II birth cohort. *Am J Epidemiol* 2007; 165: 617–24.

Sekikawa A, et al. Marine-derived n-3 fatty acids and atherosclerosis in Japanese, Japanese-American, and white men: a cross-sectional study. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52: 417–424.

Svensson M, et al. OPACH Study Group. N-3 fatty acids as secondary prevention against cardiovascular events in patients who undergo chronic hemodialysis: a randomized, placebo-controlled intervention trial. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006; 1: 780–86.

Tamura Y, et al. Clinical and epidemiological studies of eicosapentaenoic acid (EPA) in Japan. *Prog Lipid Res* 1986, 25: 461-466.

Verkerk AO, et al. Incorporated sarcolemmal fish oil fatty acids shorten pig ventricular action potentials. *Cardiovasc Res* 2006; 70: 509–20.

von Schacky C, et al. Long-term effects of dietary marine omega-3 fatty acids upon plasma and cellular lipids, platelet function, and eicosanoid formation in humans. *J Clin Invest* 1985;76:1626–31.

Wanten GJ, et al. Immune modulation by parenteral lipid emulsions. *Am J Clin Nutr* 2007;85:1171–84.

World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global prospective. Washington, DC: AICR: 2007.

Xiao YF, et al. Blocking effects of polyunsaturated fatty acids on Na⁺ channels in neonatal rat ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 92: 11000–04.

Xiao YF, et al. Fatty acids suppress voltage-gated Na⁺ currents in HEK293t cells transfected with the alpha subunit of the human cardiac sodium channel. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 2680–85.

Yokoyama M, et al, for the Japan EPA lipid intervention study (JELIS) Investigators. Effects of eicosapentaenoic acid on major coronary events in hypercholesterolaemic patients (JELIS): a randomised open-label, blinded endpoint analysis. *Lancet* 2007; 369: 1090–98.

Ringraziamenti

In particolar modo ringrazio il mio tutor, il prof. **Mario Felice Tecce**, per la sua presenza costante durante tutto il mio percorso formativo di dottorato, correggendo i miei errori senza farmi mai sentire inadeguata e stimolando la mia curiosità scientifica.

Ringrazio **il collegio docenti e la coordinatrice di dottorato**, la prof.ssa Antonietta Leone, che hanno seguito in modo attento l'organizzazione delle attività del programma di studio.

Ringrazio profondamente la dott.ssa **Mariella Caputo**, ovviamente per la sua collaborazione scientifica, ma soprattutto per avermi supportato e sopportato in qualsiasi momento di questo lungo percorso formativo. Questi quattro anni hanno permesso di costruire tra noi innanzitutto un rapporto lavorativo produttivo e stimolante, ma al contempo una leale amicizia.

Ringrazio **Dario, SegreDario & RitardaDario...**

Ringrazio il mio "**gruppetto alcolista perfetto**"...ANONIMO per ovvi e convenienti motivi (Associazione **S.G.C.A.V.D.M**)...che ha reso memorabili questi anni di dottorato.....

Ringrazio **La Beli**....che mi ha trasmesso l'amore e la passione per la ricerca....

Ringrazio **Michi**....che mi ha sostenuto costantemente con i suoi sorrisi....

Il periodo trascorso alla Columbia University di NY ha rappresentato un importante momento formativo, possibile grazie alla disponibilità del Prof. **RJ Deckelbaum** e del Prof. **R Ramasamy**.

.....Un ringraziamento speciale a **Filippo&Lella** che hanno sempre creduto nelle mie passioni e nelle mie capacità anche quando io ero la prima a dubitarne....e **Francesco** che con la sua serietà e la sua pazienza ha saputo consigliarmi nei momenti difficili....

...dedico il mio lavoro di tesi ai miei nonni...