



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA

FACOLTA' DI FARMACIA

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE FARMACEUTICHE

XXIII CICLO

Dipartimento di Scienze Farmaceutiche

Luca Vanella

**AZIONE CITODIFFERENZIANTE ED
ANTITUMORALE DELL'ACIDO ELLAGICO**

TESI DI DOTTORATO

Tutor:

Chiar.mo Prof. Giuseppe Ronsisvalle

INDICE

Introduzione	pag. 1
Capitolo 1: Genetica dei tumori	pag. 7
Capitolo 2: Ciclo cellulare	pag. 11
Capitolo 3: p53 guardiano del genoma	pag. 15
Capitolo 4: Modificazioni epigenetiche	pag. 17
Capitolo 5: PAPRs nella moltiplicazione e differenziazione cellulare	pag. 20
Capitolo 6: Apoptosi	pag. 25
Capitolo 7: Fisiopatologia dei Radicali liberi	pag. 37
Capitolo 8: Aspetti nutrizionali e cancro	pag. 43
Capitolo 9: Scopo del lavoro	pag. 46
Capitolo 10: Materiali e metodi	pag. 51
Capitolo 11: Risultati e Discussioni	pag. 58
Bibliografia	pag. 84

Introduzione

Il termine *tumore*, letteralmente significa tumefazione, è stato coniato sulla base dell'aspetto macroscopico della maggior parte dei tumori che si presentano molto frequentemente, ma non sempre, con una massa rilevante sul sito anatomico di origine.

Il termine *neoplasia*, che letteralmente significa nuova formazione, è sinonimo del precedente ma prende in considerazione, più che l'aspetto esteriore della massa, il contenuto cellulare della stessa che è costituito da cellule di “nuova formazione”. Infine il termine cancro (granchio) è stato coniato sulla base dell'osservazione che le cellule neoplastiche nel corso della loro moltiplicazione formano propaggini che avvinghiano le cellule normali vicine e le distruggono, così come il crostaceo fa con le sue chele nei riguardi della preda.

I tumori si suddividono in “benigni” e “maligni”. I primi sono costituiti da cellule che mantengono pressoché inalterate le loro caratteristiche morfologiche e funzionali, pur esibendo autonomia moltiplicativa in quanto non rispondono ai meccanismi di proliferazione cellulare. Essi sono caratterizzati da un tipo di sviluppo detto *espansivo*, in quanto comprime le cellule vicine senza disintegrarle, tanto che i tumori benigni che originano dall'epitelio ghiandolare (adenomi) sono

spesso avviluppati da una capsula di tessuto connettivo fibroso che li delimitano nettamente dai tessuti confinanti, coi quali assumono un rapporto di contiguità. I tumori maligni sono invece costituiti da cellule che appaiono morfologicamente e funzionalmente diverse dalle corrispondenti normali.

L'atipia morfologica, che è tanto spiccata quanto più indifferenziato è il tumore; essa si manifesta con mancanza di uniformità nella forma e nelle dimensioni delle cellule (polimorfismo) e degli organelli subcellulari, in particolare del nucleo, che è frequentemente ipertrofico ed in fase mitotica. Peculiare è il comportamento del tumore maligno nei riguardi dei tessuti limitrofi che vengono infiltrati e distrutti dalle cellule tumorali che si sostituiscono a quelle normali, fenomeno questo noto col termine "invasività neoplastica". L'infiltrazione delle cellule neoplastiche non si arresta di fronte alla parete dei capillari e delle venule che possono essere invase, con la conseguenza che le cellule tumorali raggiungono il circolo sanguigno dando inizio a quel processo noto con il termine di "metastatizzazione". Un'altra caratteristica dei tumori maligni è la "recidiva", cioè la riformazione del tumore nel sito di origine dopo l'asportazione chirurgica. I tumori maligni, infine, danno luogo alla "cachessia", cioè ad un progressivo e rapido decadimento

dell'organismo, che va incontro ad una notevole perdita di peso ed a fenomeni di apatia e astenia.

L'identificazione di un tumore nelle sue caratteristiche microscopiche rappresenta indubbiamente una tappa fondamentale ai fini diagnostici, prognostici e terapeutici.

Nella diagnostica clinica i due sistemi adoperati per giudicare lo stato di sviluppo di un tumore sono rappresentati dalle metodiche di gradazione e di stadiazione. Con la gradazione, che è basata su criteri riguardanti l'aspetto microscopico, si cerca di stabilire il grado di anaplasia intesa come riduzione delle caratteristiche di differenziazione e di organizzazione tipiche delle cellule normali. Mentre sotto l'aspetto istologico si prendono in considerazione le alterazioni relative ai rapporti che le cellule tumorali assumono tra loro, con lo stroma e i tessuti sottostanti, invece sotto l'aspetto citologico si prende in considerazione la somiglianza con quelle del tessuto di origine e la presenza di mitosi tipiche e atipiche. Ai fini prognostici si è stabilito che esiste una correlazione tra livello di anaplasia e velocità di crescita del tumore.

La gradazione procede attraverso l'individuazione di 4 gradi espressi con i numeri romani da I a IV, indicando col grado I il tumore ben differenziato e col grado IV quello molto anaplastico.

Alla gradazione si affianca la stadiazione dei tumori che si effettua col sistema TNM, così denominato perché prende in considerazione i seguenti parametri:

- T = Estensione del tumore primitivo
- N = Stato dei linfonodi regionali, e per i tumori di alcune regioni, dei linfonodi juxtaregionali
- M = Assenza o presenza di metastasi

L'aggiunta di numeri alla lettera T indica l'aumento graduale delle dimensioni del tumore primitivo e/o l'estensione locale dello stesso. Si adoperano numeri da 1 a 4 corrispondenti ai valori che variano secondo la regione interessata.

L'utilizzazione del sistema TNM si è dimostrata di grandissima utilità per l'applicazione dei protocolli di chemio e radioterapia. Dalla combinazione dei valori attribuiti a T, N ed M e di quelli attribuiti alla gradazione si arriva alla identificazione dello stadio nel quale si trova il tumore. Il grading istopatologico del carcinoma della prostata, che tenta di definire la potenziale malignità biologica del tumore in base alle sue caratteristiche citologiche, viene valutato tramite la classificazione di Gleason. Quest'ultima si avvale di un'analisi citologica definita come

“score istopatologico” determinato dalla somma aritmetica del valore dei due quadri ghiandolari predominanti nel tessuto.

Esistono altri sistemi di classificazione, ma la scala di Gleason è la più comune. Essenzialmente al tumore è assegnato un grado compreso tra 1 e 5, secondo la struttura delle cellule anormali. Il grado più basso è assegnato alle cellule maligne con aspetto e funzioni simili alle cellule normali.

- GRADO I: Le cellule conservano ancora l'aspetto delle cellule prostatiche normali. Le cellule maligne hanno un colore chiaro e crescono vicine.
- GRADO II: Il tessuto ha l'aspetto del grado I, ma le cellule anormali crescono meno compatte e possono aver invaso il tessuto muscolare circostante.
- GRADO III: Il tessuto anormale ha un colore più scuro e le cellule assumono forme diverse. Si ha una proliferazione nel tessuto muscolare maggiore rispetto al grado II.
- GRADO IV: La proliferazione delle cellule diviene sempre più anormale.
- GRADO V: L'accrescimento del tessuto maligno è vario a livello cellulare.

Il valore più basso possibile della scala di Gleason è 2 ed il più alto 10.

La stadiazione del carcinoma della prostata, è un mezzo che consente di sommare le informazioni ottenute dalla biopsia, dall'ecografia, dalla scala di Gleason ed altri strumenti diagnostici.

Gli stadi del tumore alla prostata vanno da 1 a 4 e la prognosi diviene più grave ad ogni stadio.

- STADIO 1: Le cellule maligne sono confinate nella prostata e non hanno invaso i linfonodi o altri organi. I valori nella scala di Gleason sono compresi tra 2 e 4, meno del 5% della prostata è costituita dal tessuto maligno in accrescimento. In questo caso il tumore è circoscritto ed esente da coinvolgimento dei linfonodi e da metastasi.
- STADIO 2: I valori della scala di Gleason sono più alti ed oltre il 5% della ghiandola prostatica mostra tessuto maligno in accrescimento.
- STADIO 3: Le cellule maligne hanno invaso le vescicole seminali ma non i linfonodi ed altri organi.
- STADIO 4: I linfonodi, il tessuto pelvico e gli organi più distanti vengono invasi dalle cellule maligne e il tumore risulta esteso con ampio interessamento linfonodale e localizzazioni metastatiche.

Capitolo 1: Genetica dei tumori

Le cellule durante il ciclo cellulare possono affrontare tre scelte: dividersi, specializzarsi o suicidarsi. Il balance tra queste, determina il numero di cellule presenti in un tessuto. Se la mitosi procedesse indipendente dai processi di morte cellulare programmata, un uomo di 80 anni avrebbe due chilometri quadrati di cute, due tonnellate di midollo osseo, 16 chilometri di intestino. I meccanismi molecolari coinvolti nella proliferazione, differenziazione, sopravvivenza cellulare ed apoptosi sono regolati per rispondere alle necessità ed agli stress metabolici dell'organismo; questa regolazione manca nelle cellule tumorali che proliferano in maniera incontrollata.

Lo sviluppo di una neoplasia è un processo multifattoriale; l'alimentazione, gli stress ambientali chimici e fisici, le infezioni da virus, l'ereditarietà l'infiammazione cronica hanno un ruolo chiave nel processo di trasformazione neoplastica.

Da un punto di vista eziopatogenetico il cancro può essere considerato una malattia genetica caratterizzata dall'acquisizione di mutazioni multiple in geni diversi. Il tumore ha un'origine monoclonale cioè si sviluppa a partire da una singola cellula che, esposta ad un agente mutageno, subisce un danneggiamento irreversibile del proprio DNA.

L'accumulo di mutazioni crea una selezione di cellule caratterizzate da una capacità sempre crescente di proliferazione e sopravvivenza cellulare, da una mancata differenziazione e da una riduzione del processo apoptotico; questa evoluzione dura anni se non decenni. Infine, se un soggetto è già portatore nel suo DNA di una o più mutazioni in geni cruciali per il controllo della proliferazione cellulare (geni gate-keepers) o coinvolti nei meccanismi di riparazione e sorveglianza dell'integrità del DNA (geni care-takers) il rischio di sviluppare tumore sarà maggiore. Il tumore è generato da un disequilibrio tra geni che regolano la proliferazione cellulare (onco-gene e suppressor-gene) e l'apoptosi intesa come capacità di sfuggire ai segnali di morte. Tale disequilibrio è dovuto ad un accumulo di mutazioni genetiche che fanno acquisire alla cellula un fenotipo caratterizzato da:

- proliferazione incontrollata
- resistenza all'apoptosi
- resistenza ai segnali antiproliferativi
- incapacità di entrare nella fase G₀ del ciclo cellulare
- invasività
- metastasi
- proto-oncogene mutato ed onco-suppressore mutato.

I proto-oncogene sono geni che, in condizioni fisiologiche, regolano la proliferazione, la differenziazione e l'accrescimento cellulare esprimendo proteine che agiscono come fattori di crescita.

Queste molecole sono proteine di basso peso molecolare che dopo essere state sintetizzate fuoriescono dalla cellula trasferendosi nello spazio intercellulare dove, riconosciute da recettori posti sulla membrana di altre cellule, attivano una serie di reazioni che hanno come effetto ultimo la mitosi; in particolare i fattori di crescita, noti come fattori di competenza possono indurre il passaggio di una cellula dalla fase G₀ alla G₁ del ciclo cellulare (fattore di crescita dell'epidermide), oppure possono indurre il passaggio dalla fase G₁ a quella di S (fattori di progressione, es. IGF1).

Gli onco-suppressorgene comprendono i “ gate-keepers” ed i “care-takers; i primi controllano la porta di ingresso delle vie che conducono alla proliferazione cellulare e sono tipicamente regolatori negativi; i secondi, invece, controllano l'accuratezza del ciclo cellulare cioè questi geni sono deputati alla riparazione del DNA ed al controllo della stabilità del genoma. La mutazione di un proto-oncogene e/o di un suppressorgene avviene con gli stessi meccanismi degli altri geni cioè può avvenire in modo spontaneo oppure può essere indotta da agenti

mutageni esterni (sostanze chimiche, radiazioni, virus).

Le mutazioni che avvengono nei proto-oncogene sono dominanti pertanto basta una mutazione in uno dei due alleli affinché la cellula viene stimolata a proliferare, invece, le mutazioni degli suppressorgene sono recessivi. Alcuni soggetti possono ereditare una copia mutata del gene oncosoppressore pertanto la probabilità che insorga un tumore in questi soggetti è molto maggiore; ciò che viene ereditato non è la malattia bensì la predisposizione. Le donne che ereditano i geni BRCA1 e BRCA2 hanno un'altissima probabilità di sviluppare un tumore al seno. Recentemente è stato ipotizzato che le neoplasie derivano da cellule staminali mutate che si moltiplicano ma che non riescono a differenziarsi; infatti staminali e cellule neoplastiche condividono alcune caratteristiche (immortalità, resistenza all'apoptosi, incapacità di differenziarsi). Il trattamento con chemioterapici malgrado produca una riduzione della massa tumorale lascia inalterata la frazione staminale che sarà responsabile della recidività.

Capitolo 2 : Ciclo cellulare

Quando la cellula raggiunge una certa dimensione e vi sono certe condizioni deve dividersi. Il ciclo cellulare consiste in una serie di eventi coordinati che avvengono tra una divisione cellulare e l'altra. La durata del ciclo varia al variare della specie, del tipo di cellula e delle condizioni di esse. Per una cellula umana in rapida proliferazione la durata del ciclo è di circa 24h.

Nel ciclo cellulare si distinguono tre fasi, l'interfase (il tempo che intercorre tra la fine della mitosi e l'inizio della successiva), la mitosi e la citodieresi (Fig. 1). L'interfase comprende la fase G1, S e G2; la fase G1 è la fase piu' lunga (circa 11h); essa è caratterizzata da una intensa attività metabolica (sintesi di RNA e proteine necessarie per la sintesi del DNA). Durante questa fase la concentrazione di cicline D aumenta ed il complesso ciclinaD/Cdk fosforila la pRb con conseguente rilascio del fattore di trascrizione E-2F, necessario per l'attivazione di geni che trascrivono mRNA per proteine enzimatiche. In questa fase i complessi ciclinaE/Cdk e ciclina A/Cdk attivano per fosforilazione molte proteine ed enzimi coinvolti nella sintesi del DNA.

Nella fase G2 la cellula possiede un numero doppio di cromosomi e deve duplicare tutti gli altri componenti cellulari per poterli distribuire

nelle due nuove cellule. I complessi ciclinaA/Cdk e ciclinaB/7Cdk sono attivi e sono necessari per passare alla fase M. Nell'organismo adulto la maggior parte delle cellule non si divide ma rimane per un tempo variabile in una fase di riposo (Go) ciò si realizza quando vengono a mancare i fattori di crescita tuttavia le cellule possono riprendere il ciclo in seguito alla presenza di questi; durante la rigenerazione di una ferita i fibroblasti che erano in Go, riprendono il ciclo in quanto stimolati dal fattore di crescita (PDGF) rilasciato dalle piastrine durante la coagulazione del sangue. In Go le cicline D sono presenti in bassa concentrazione e la proteina-Rb è ipofosforilata.

Regolazione del ciclo cellulare - Il sistema di controllo del ciclo è affidato ad una famiglia di proteine chinasi cicline dipendenti (Fig. 2); queste chinasi sono attivate quando sono complessate con le cicline: il legame con le cicline induce una modificazione conformazionale nella struttura delle chinasi consentendo l'accesso dei substrati al sito catalitico (Norbury C. et al., 1992; Forsburg S. et al., 1991). L'attività di queste chinasi cicline dipendenti può inoltre essere regolata da altri meccanismi. L'attivazione del complesso cicline/Cdk richiede una fosforilazione in corrispondenza del residuo 160 della treonina; questa reazione di attivazione è catalizzata da un enzima noto come CAK (Cdk

chinasi attivante); contrariamente alla fosforilazione attivante esiste un'altra fosforilazione inibente in corrispondenza di un residuo 14 di treonina e 15 di tirosina (Malumbres M. et al., 2005). Questa fosforilazione inibitoria può essere rimossa da specifiche fosfatasi. Oltre alla regolazione di tipo fosforilativo l'attività di queste chinasi cicline dipendenti può essere inibita da specifiche proteine note come KIP e INK le prime non sono selettive (p21; p27; p57) si legano al complesso cicline/Cdk. La p21 è un regolatore negativo che è sotto il controllo del fattore di trascrizione p53 (Fig. 3).

La p21 può anche inibire la sintesi del DNA interagendo con una subunità della DNA polimerasi delta. Le INK sono inibitori selettivi (p15; p16; p18; p19) e si legano alle Cdk prima di legarsi alle cicline. (Gao F.H. et al., 2010). Un'altra proteina nota come pRb svolge un ruolo chiave nella regolazione del ciclo cellulare (Fig. 4).

Il retinoblastoma è un tumore della retina sporadico o ereditario causato dalla mutazione di un gene oncosoppressore noto come Rb che esprime una proteina mutata non funzionante (pRb); questa proteina non funzionante è stata riscontrata anche in altri tumori (carcinomi della vescica, della mammella e del polmone). La pRb promuove il ciclo cellulare quando è fosforilata mentre quando è defosforilata lo inibisce.

La fosforilazione è catalizzata, alla fine della fase G1, da un complesso CdK2/4/6/ciclinaD per essere poi defosforilata alla fine della mitosi.

Alla forma non fosforilata è legato un fattore di trascrizione noto come E2F questo link impedisce al fattore di trascrizione di svolgere la sua azione. Quando la pRb viene fosforilata rilascia il fattore di trascrizione che attiva alcuni geni che trascrivono mRNA per proteine coinvolte nella progressione del ciclo (fase S). Le proteine chinasi sono enzimi che regolano positivamente o negativamente per fosforilazione proteine ed enzimi. Le CdK sono chinasi che vengono attivate quando sono complessate con le cicline i cui livelli fluttuano durante il ciclo cellulare (Maher D.M. et al., 2010).

Check point del ciclo cellulare - Nelle varie fasi del ciclo cellulare il coordinamento tra le diverse fasi del ciclo cellulare dipende da una serie di punti di controllo (checkpoint) che registrano segnali intra ed extracellulari, questi servono ad assicurare che tutti gli eventi di una particolare fase siano stati completati prima che inizi la fase successiva. Un danno al DNA blocca il ciclo cellulare nella fase G1; questo punto di controllo permette che il DNA venga riparato prima che esso venga duplicato. Questo controllo è mediato dalla p53 (Russel P., 1998; Kastan M.B. et al., 2004).

Capitolo 3: p53 guardiano del genoma

La p53 è un fattore di trascrizione costituito da 393 residui di aminoacidi espresso da un gene oncosoppressore. Questa proteina in condizioni normali è poco espressa; la sua funzione è quella di bloccare il ciclo cellulare in condizione di stress che danneggiano il DNA, per questo motivo è chiamata il guardiano del genoma (Santoro R. et al., 2010). La p53, attivata per fosforilazione di un residuo di serina, stimola la trascrizione di un gruppo di geni tra cui il gene che trascrive la proteina per la p21; questa proteina è un regolatore negativo di chinasi ciclina dipendenti cioè la p53 ostacola la progressione del ciclo cellulare nella fase G1; tale sospensione dà alla cellula l'opportunità di riparare il danno del DNA; qualora questo non si realizzasse la p53 attiva il processo apoptotico della via estrinseca ed intrinseca (up-regulation di proteine proapoptiche Bax e/o over-espressione dei recettori di morte); inoltre la p53 è in grado di legare Bcl-2 e BclXl questo consente a Bax o Bak di sganciarsi da Bcl-2 ed esercitare l'azione apoptotica. I danni del DNA non riparati attivano il processo apoptotico, questo rappresenta una risposta vantaggiosa perché elimina cellule che potrebbero trasformarsi in cellule neoplastiche (Veeraraghavan J. et al., 2010). Una mutazione del gene p53 oltre a consentire la progressione incontrollata

del ciclo cellulare permette la respicazione del DNA danneggiato aumentando la frequenza delle mutazioni (Vousden K.H., 2002). Le mutazioni a carico dei geni soppressori dei tumori sono recessive quindi sono richieste mutazioni in entrambi le copie dei geni perchè si verifichi la trasformazione della cellula. Le cellule che non esprimono p53 non vanno in apoptosi in risposta ad agenti che danneggiano il DNA.

Capitolo 4: Modificazioni epigenetiche

L'epigenetica è una branca della biologia molecolare che studia la regolazione dell'espressione genica attraverso reazioni post-replicative del DNA quali la metilazione del DNA e le modificazioni degli istoni (acetilazione, metilazione, fosforilazione); queste non comportano cambiamenti nel codice genetico ma possono modificare il fenotipo e possono essere trasmissibili alla progenie. La metilazione del DNA, catalizzata dall'enzima *DNA metiltransferasi (DNMT)* induce uno stato conformazionale trascrizionalmente inattivo della cromatina cioè la cromatina assume una struttura più compatta (eterocromatina); inoltre le reazioni epigenetiche alterano l'accessibilità al genoma di molecole che regolano l'espressione genica (fattori di trascrizione). Tale processo è coinvolto nel silenziamento di geni interessati nella proliferazione (silenziamento di geni onco-soppressori) e differenziazione cellulare. L'imprinting genomico è anche un fenomeno basato su modificazioni epigenetiche (metilazione selettiva di alcuni geni); normalmente la copia materna e paterna del gene sono ugualmente espresse; modificazioni epigenetiche possono causare una espressione diseguale dell'allele di origine paterna da quello di origine materna cioè un gene si può esprimere in maniera diversa a secondo se è stato ereditato dal padre o

dalla madre; un gene è sottoposto a imprinting materno quando viene inibita selettivamente l'espressione dell'allele materno e la proteina viene prodotta utilizzando l'allele paterno (insulin-like growth factor 1). Queste modificazioni poichè interessano la gametogenesi si possono trasmettere alla progenie e possono essere associate a patologie. La metilazione del DNA è coinvolta nell'inattivazione casuale di uno dei cromosoma X materni durante l'embriogenesi; infatti se i geni X-linked venissero espressi allo stesso modo in ogni sesso le femmine avrebbero una quantità doppia di prodotto rispetto ai maschi. L'X inattivo si condensa in una struttura compatta nota come corpo di Barr. La metilazione interessa sequenze CpG note come "Isole CpG" localizzate nei promotori dei geni costitutivi. Queste isole rappresentano 1-2 % del genoma umano. Alcune patologie come i tumori hanno una componente epigenetica; questi sono caratterizzati da un silenziamento di geni preposti ai processi di riparazione del DNA, alla proliferazione (disattivazione dei geni onco-soppressori) e differenziamento cellulare. Non a caso epimutazioni sono state riscontrati in molti tumori. Le reazioni epigenetiche forniscono la spiegazione di come il genoma possa essere influenzato dall'ambiente. Le piante pur non possedendo un sistema nervoso possono memorizzare i cambiamenti stagionali.

L'esposizione di queste al freddo durante la stagione invernale provoca cambiamenti conformazionali della cromatina che si traducono nel silenziamento di geni coinvolti nella fioritura; questi geni sono poi riattivati nella stagione primaverile. Due gemelli monoovulari possono essere geneticamente identici ma non epigenicamente, cioè il nostro genoma può essere influenzato dall'ambiente e dalla dieta. Le modificazioni epigenetiche possono essere coinvolte nel polimorfismo; la metilazione della citosina e successiva deaminazione porta alla formazione di una base diversa (timina) che comporterà un appaiamento diverso nella duplicazione del DNA con successiva formazione di un nuovo trascritto e quindi di una proteina strutturalmente diversa.

Capitolo 5: PPARs nella moltiplicazione e differenziazione cellulare

Il nome a PPAR-s (peroxisomal proliferators activated receptors, recettori nucleari attivati dai proliferatori dei perossisomi) deriva dalle osservazioni indotte da molecole note come fibrati; questi portavano, nei roditori, alla proliferazione dei perossisomi, corpuscoli intracellulari adibiti all'ossidazione di vari xenobiotici e degli acidi grassi. I PPARs sono fattori di trascrizione nucleari appartenenti alla famiglia dei recettori steroidei; sotto forma di eterodimeri si trovano complessati con il recettore X dell'acido 9-cis-retinoico (RXR); la formazione dell'eterodimero PPAR-RXR ha luogo quando uno dei due recettori è attivato. Quando entrambi i siti di legame sono occupati, in seguito alla somministrazione contemporanea dei due agonisti, si osservano risposte sinergiche. I PPARs sono caratterizzati da cinque domini un dominio variabile, due impegnati nel riconoscimento di proteine regolatrici, una regione deputata al legame con il ligando ed una coinvolta con il legame con il DNA. Gli enzimi istoni acetiltransferasi (HAT) ed istoni deacilasi agiscono da regolatori trascrizionali cioè l'acetilazione degli istoni induce una decondensazione della cromatina facilitandone la trascrizione, l'inverso fa la deacilazione. L'acetilazione degli istoni in

corrispondenza dei residui aminici della lisina, neutralizzando la carica positiva di queste proteine, riduce l'affinità di queste con il DNA consentendo a quest'ultimo di raggiungere specifiche conformazioni atte a rilasciare corepressori e consentire l'ingresso di coattivatori. Il DNA compatto non è in condizione di trascrivere, perchè possa essere accessibile ai fattori di trascrizione è necessario il rilascio di corepressori e l'ingresso dei coattivatori con conseguente rimodellamento strutturale. In uno stato eterodimerico con il recettore X dell'acido 9-cis-retinoico e non attivati da ligandi, i PPARs sono legati ad un complesso di corepressori aventi attività istone deacilasi con conseguente inibizione della trascrizione genica; in seguito al legame con un ligando endogeno (metaboliti dell'acido arachidonico e/o acidi grasso polinsaturi omega 3) o esogeno, gli eterodimeri rilasciano i corepressori reclutando i coattivatori con attività istone acetiltransferasi, questo consente al fattore di trascrizione di interagire con il DNA con attivazione della trascrizione (Tontonoz P et al., 1997).

I PPAR-s sono coinvolti in diversi meccanismi molecolari; stimolando la trascrizione dei geni oncosoppressori inibiscono la proliferazione cellulare; inoltre sono coinvolti nella differenziazione cellulare, apoptosi, nella attivazione dell'espressione dei geni che

partecipano alla beta-ossidazione mitocondriale e perossisomiale degli acidi grassi e nell'omeostasi glicemica (Guan Y.F. et al., 1999). L'attività trascrizionale dei PPARs può essere regolata per fosforilazione mediata da AMPK, ERK1/2 e JNK e defosforilazione; a seconda del sito di fosforilazione si può avere una attivazione o inibizione.

I PPARs sono una famiglia di fattori trascrizionali di cui si conoscono diverse isoforme espresse da geni diversi; le varie isoforme presentano una diversa localizzazione tissutale e funzionale. PPAR-alfa sono presenti, nel fegato, tessuto adiposo bruno, cuore, muscolo scheletrico, rene, cellule endoteliali, cheratinociti ed intestino; i ligandi naturali sono gli omega 3, il leucotriene B4 e le PGI2 mentre quelli sintetici sono i fibrati; sono coinvolti nella differenziazione dei cheratinociti mentre nel muscolo scheletrico attivano l'espressione di geni che trascrivono mRNA per proteine che partecipano alla beta ossidazione mitocondriale e perisossomiale degli acidi grassi e l'espressione di geni che codificano proteine coinvolte nel trasporto degli acidi grassi come la carnitina palmitoil transferasi epatica. I PPAR-alfa sono overespressi nel digiuno prolungato e dopo un esercizio fisico prolungato come una risposta metabolica adattativa.

I PPAR-beta o delta hanno una distribuzione ubiquitaria (cervello,

fibre del muscolo scheletrico, rene e colon). La loro azione è molto simile alle isoforme alfa; gli agonisti inducono uno shunt dell'utilizzazione del glucosio a favore degli acidi grassi, inoltre la loro attivazione aumenta i livelli di HDL. I PPAR-gamma sono presenti principalmente nel tessuto adiposo ma si trovano anche nel tessuto muscolare scheletrico e nel fegato. Si conoscono diverse isoforme, PPAR-gamma-1-3 con diversa localizzazione tissutale. I PPAR-gamma2 sono coinvolti nella differenziazione delle cellule staminali mesenchimali in adipociti e nell'anabolismo lipidico che prevede la sintesi e l'immagazzinamento dei grassi negli adipociti infatti aumentano l'espressione dell'Acil-CoA sintetasi cioè I PPAR-gamma hanno un ruolo adipogenetico e lipogenetico.

I PPAR-gamma regolano l'omeostasi glicemica: a) inducono alcuni geni che codificano proteine coinvolte nella traduzione di proteine del segnale dell'insulina come IRS-1-2 e il fosfatidilinositolo-3-chinasi; b) aumentano l'up-take del glucosio inducendo un'overespressione dei GLUT-4; c) riducono l'espressione di enzimi coinvolti nella gluconeogenesi; d) riducono la sintesi di TNF-alfa; e) aumentano i livelli di adiponectina; tutte queste condizioni aumentano la sensibilità all'insulina. I ligandi naturali come gli acidi grassi polinsaturi omega 3

(ALA, DHA ed EPA) provocano un arresto del ciclo cellulare in fase G1 con induzione di markers di differenziamento; inoltre la loro attivazione riduce l'espressione dei geni antiapoptotici; quando l'attivazione dei PPAR-gamma viene meno si ha un aumento dell'espressione dei geni antiapoptotici con blocco dell'apoptosi ed evoluzione della cellula in cellula neoplastica (Mueller E. et al., 1998; Tronstad K.J. et al., 2002). Agonisti endogeni (tiazolidinedioni) attivano il complesso PPAR-gamma-RXR consentendo che questo si possa legare al DNA promuovendo così la trascrizione di diversi geni.

Capitolo 6: Apoptosi

Nel corso degli ultimi trent'anni sono state definite morfologicamente e molecularmente due forme di morte cellulare fondamentalmente differenti, l'apoptosi e la necrosi.

La necrosi è un processo passivo che non richiede energia; sopravviene come conseguenza di stimoli chimici, fisici e metabolici (ischemia). È caratterizzata da una deplezione di ATP, blocco delle pompe ioniche, aumento del calcio citosolico con attivazione delle fosfolipasi e rilascio di fosfolipidi dalla membrana citoplasmatica, dilatazione del reticolo endoplasmatico, rigonfiamento dei mitocondri, distruzione della membrana citoplasmatica con rilascio del contenuto citosolico nello spazio intercellulare; questo provoca una risposta infiammatoria locale.

Andrew Wyllie attraverso immagini di microscopio elettronico osservò che alcune cellule si isolavano dal tessuto, si frammentavano e sparivano di scena come foglie di un albero che ad una ad una appassiscono e si staccano dal ramo. Questa immagine di morte è stata chiamata apoptosi o morte cellulare programmata. In un individuo adulto muoiono per apoptosi nelle 24 ore $50-70 \times 10^6$ cellule. L'apoptosi è caratterizzata da modificazioni morfologiche e biochimiche: distacco

delle cellule vicine, diminuzione di volume cellulare con addensamento degli organelli, disgregazione del nucleolo, condensazione della cromatina e successiva frammentazione del nucleo e clivaggio del DNA nucleare in frammenti da 50-300 kilobasi per attivazione di una endonucleasi (quando questo DNA frammentato viene separato tramite elettroforesi in gel di agarosio ed il gel colorato con bromuro di etidio si osserva un caratteristico pattern a ladder); diversi frammenti di materiale nucleare raggiungono la membrana citoplasmatica dove vengono circondati da estroflessioni della membrana (blebs) che conferiscono alla cellula un aspetto a bolle (blebbing). Le blebs si staccano dal corpo cellulare, trascinando con esse parte del citoplasma e del materiale cellulare (compreso parte del nucleo) dando origine ai corpi apoptotici che vengono fagocitati dai macrofagi ai quali vengono richiamati nell'area interessata. Poiché non si ha il rilascio del contenuto citosolico nello spazio extra-cellulare non si verifica nessun processo flogistico e riparativo. Nel processo apoptotico sono coinvolti geni pro-apoptotici ed anti-apoptotici (Fig. 5).

Ruolo fisiologico dell' apoptosi - Un programma apoptotico è altamente conservato nell'evoluzione, dai nematodi all'uomo; esso è presente in forma latente in ogni singola cellula di un organismo pluricellulare. Una

volta attivato, la cellula muore attraverso varie tappe che durano da 30 a 120 minuti, la completa rimozione dei corpi apoptotici si realizza entro 24 ore. L'apoptosi è importante quanto la mitosi, l'apoptosi è fondamentale nell'embriogenesi durante la quale alcune cellule si suicidano per fare posto ad altre cellule indispensabili per la vita postnatale (rimodellamento tissutale); il riassorbimento della coda nella metamorfosi del girino in rana, le regressioni delle pliche interdigitali durante lo sviluppo embrionale, la scomparsa di intere popolazioni neuronali che non riescono a stabilire connessioni funzionali sinaptiche, la diminuzione del numero delle cellule della ghiandola mammaria quando viene a cessare lo stimolo della prolattina così anche la morte delle cellule endometriali prima del ciclo mestruale sono da attribuire al processo apoptotico. L'apoptosi può essere intesa come una forma di suicidio indolore altruista intesa come sacrificio di alcuni per il bene di tutti; infatti, ogni qualvolta un danno rischia di compromettere gravemente la funzionalità di una cellula questa viene inviata al suicidio per evitare che l'errore si trasmetta alla progenie. Le cellule infettate da virus subiscono spesso la morte cellulare programmata impedendo così la diffusione nell'organismo di particelle virali. Nel caso del danneggiamento del DNA (mutazioni) l'apoptosi può eliminare cellule

che potrebbero trasformarsi in cellule neoplastiche. La cellula affronta, in risposta a specifici stimoli, tre scelte: dividersi, differenziarsi o suicidarsi; dall'equilibrio di queste tre scelte dipende il numero di cellule in un tessuto; cioè l'apoptosi è coinvolta nell'omeostasi cellulare (produzione di nuove cellule ed eliminazione di cellule vecchie).

Un blocco dell'apoptosi può causare la formazione di cellule indesiderate, viceversa un'elevata incidenza può tradursi in una perdita cellulare con conseguente carenza di funzionalità di organi o tessuti (Morbo di Alzheimer, Parkinson, SLA). Cosa spinge le cellule a morire? Dal bilancio tra segnali positivi per la sopravvivenza (NGF, IL-3, IGF-1) e segnali negativi di morte extra (TNF-alfa, IL-1beta) e intra-cellulare dipende la sopravvivenza o la morte per apoptosi. Il processo apoptotico si può realizzare attraverso due vie: una estrinseca mediata da recettori e l'altra intrinseca mediata dai mitocondri, tra queste due vie esiste un ampio cross-talk. In entrambe le vie si distinguono diverse fasi: induzione, esecuzione, riconoscimento e fagocitosi. L'induzione è un "cross talk" tra segnali di morte cellulare e l'espressione di proteine pro e anti apoptotiche; l'esecuzione consiste nell'attivazione a cascata delle caspasi; il riconoscimento e la fagocitosi del corpo cellulare è caratterizzato dalla presenza sulla membrana citoplasmatica esterna di

segnali di riconoscimento per i macrofagi. La fosfatidilserina è un costituente normale della membrana citoplasmatica ma localizzata sul versante citoplasmatico del doppio strato fosfolipidico.

L'esternalizzazione della fosfatidilserina sul versante esterno rappresenta un segnale di riconoscimento.

Ruolo delle caspasi nel processo apoptotico - Le caspasi sono metallo-proteasi che presentano nel sito catalitico un residuo di cisteina; esse catalizzano la scissione idrolitica del legame peptidico cui partecipa l'acido aspartico con il suo gruppo carbossilico. Possono essere iniziatrici (caspasi 2, 8, 9, 10) e caspasi esecutrici (caspasi 3, 6, 7), entrambe si trovano nel citosol allo stato inattivo. Le pro-caspasi iniziatrici (caspasi 8) sono attivate a monte da proteine adattatrici; queste attivate tagliano preforme inattive delle pro-caspasi esecutrici (pro-caspasi 3) che a sua volta attivano le procaspasi iniziatrici. Le pro-caspasi iniziatrici sono costituite da tre domini quello N-terminale è inibitorio; effettuato la rimozione di questo la grande e la piccola subunità si aggregano per formare un eterodimero questi a sua volta si aggregano dando origine alla forma attiva (tetramero). Il distacco del dominio inibitore può avvenire in due modi: per via autocatalitica in seguito dell'interazione del proenzima inattivo con fattori di iniziazione

oppure per azione di una caspasi già attivata. Le caspasi presenti nel citosol si sottraggono allo stato inattivo; vengono controllate da inibitori endogeni (IAPs) che possono inibire sia le procaspasi che le caspasi.

Via estrinseca mediata da recettori - Questo pathway richiede, per la fase dell'induzione, la presenza di recettori sulla membrana citoplasmatica. Le molecole segnale possono essere solubili (TNF-alfa, CD-95) o essere presenti sulla superficie di altre cellule che entrano in diretto contatto con la cellula "condannata a morire". I recettori di morte coinvolti sono il TNFR, FAS (CD-95 Apo1). Il recettore CD-95 essendo omotrimerico, necessita di tre molecole di ligando per formare un "cluster" di attivazione. Il recettore nella regione citoplasmatica presenta un dominio di morte (DD). Il legame del ligando con il recettore provoca l'aggregazione delle subunità con modificazioni conformazionali che vengono trasmesse ai domini di morte presenti nelle regioni del citosol del recettore; queste reclutano molecole proteiche adattatrici dette FADD (Fas Associated-Death-Domain protein) che possedendo un dominio di morte (DED) sono in grado di legare ed attivare la procaspasi 8 (regolatrice o iniziatrice) con successiva attivazione a cascata della procaspasi-3 (esecutrice) che degradano le proteine cellulari ed il DNA avendo rimosso un inibitore della DNAasi; tale clivaggio è responsabile

del quadro apoptotico. L'attivazione delle caspasi iniziatrice consiste in un auto clivaggio di due molecole di procaspasi, rilascio del dominio inibitorio e formazione di un tetramero attivo. Il distacco del dominio inibitore può avvenire in due modi: per via autocatalitica oppure per azione di una caspasi già attivata sulla procaspasi. L'attivazione delle caspasi esecutrici avviene solo per scissione proteolitica. Spesse volte l'attivazione della procaspasi 8 non è sufficiente ad indurre apoptosi, pertanto in alcune cellule, è necessaria una amplificazione della via estrinseca mediata dalla via intrinseca; la caspasi 8 infatti può clivare Bid in tBid (t= tronco) che ha un effetto proapoptotico in quanto favorisce la oligomerizzazione di Bax e Bak con conseguente rilascio del citocromo c dal mitocondrio. Il segnale apoptotico può essere inattivato da molecole citosoliche (Flip) queste avendo una struttura caspasi-like possono legarsi alle molecole adattatrici FADD impedendo alle procaspasi 8 di legarsi a FADD cioè Flip costituisce un blocco del segnale apoptotico. La mancata produzione di Flip rende le cellule sensibili all'apoptosi. Il recettore TNF-R è simile a quello del CD95, con la differenza che il DD del recettore non è in grado di legare la molecola adattatrice FADD ma necessita di un'altra proteina adattatrice chiamata TRADD (TRF associated death domain protein) che può

successivamente legare FADD. Non sempre la stimolazione di TNF-R causa morte, anzi molto spesso avviene il contrario. Questa regolazione della risposta non è mediata da Flip (fattore antiapoptotico) ma da una via alternativa; infatti TRADD in alternativa a FADD, che genera segnali proapoptotici, può legare RIP, una serin-treonin chinasi, da cui si origina un segnale alternativo antiapoptotico via NIK (NFkB inducing kinase) che per fosforilazione attiva IKK (IkB chinasi) promuovendo il rilascio del fattore di trascrizione NFkB dal suo inibitore (IkB); a sua volta NFkB trasloca nel nucleo attivando la trascrizione di geni che codificano proteine di sopravvivenza anti-apoptotiche (IAPs, Flip, Bcl-2) antagonizzando così l'azione dei fattori proapoptotici. La morte cellulare indotta dal TNF-alfa gioca un ruolo minore se comparata all'azione proinfiammatoria indotta da TNF-alfa. La capacità di indurre la morte cellulare è ridotta quando viene paragonata a quella di altre molecole della stessa famiglia (es. CD-95) ed è sempre mascherata degli effetti antiapoptotici dell'NFkB.

Via intrinseca o mitocondriale - È mediata da segnali di morte intracellulari (danni al DNA, stress ipossico). Uno degli eventi precoci è la caduta del potenziale di membrana mitocondriale che normalmente è mantenuta dalla catena respiratoria; questo evento causa un aumento

della permeabilità della membrana mitocondriale esterna con rilascio di fattori pro-apoptotici come il citocromo c ed il diablo o smac (second mitochondria derived activator of caspase) che innescano il processo apoptotico. Le Bcl-2 (B cell- lymphoma-2) sono una famiglia di geni che esprimono proteine che regolano la permeabilità della membrana mitocondriale esterna; queste possono essere sia pro-apoptotiche (Bad, Bak, Bax, Bim, Bid) che anti-apoptotiche (Bcl-2, Bcl-XL). L'effetto regolatorio si realizza attraverso l'attivazione o l'inattivazione di un poro MPT (mitochondrial permeability transition pore). Nel citosol queste proteine agiscono da sensori della sopravvivenza o della morte cellulare. La oligomerizzazione di queste proteine può portare alla formazione di eterodimeri o omodimeri. Gli omodimeri anti-apoptotici sono Bcl-2-Bcl-2, gli omodimeri pro-apoptotici sono Bax-Bax, mentre gli eterodimeri Bax-Bcl-2 sono inattivi. Dal *balance* di queste proteine anti e pro apoptotiche dipende la permeabilità della membrana mitocondriale esterna; quando questa è alterata, si ha un rilascio nel citosol di citocromo c e di altre molecole pro-apoptotiche AIF (fattori inducenti l'apoptosi come ad es diablo\smac); queste neutralizzano diversi inibitori dell'apoptosi la cui funzione è quella di bloccare l'attivazione delle caspasi. Il citocromo c, rilasciato nel citosol, induce nella Apaf-1

(apoptotic peptidase activity factor-1) una modificazione conformazionale che consente di legare insieme al dATP la procaspasi 9 attivandola per clivaggio; il complesso multienzimatico così formato è chiamato aptosoma. Successivamente la caspasi 9 regolatrice attiverà la procaspasi -3 in caspasi-3 (esecutrice)

Apoptosi e sopravvivenza cellulare: regolazione - Nella regolazione della morte cellulare programmata sono coinvolti diversi geni: geni induttori (p53), geni effettori ed esecutori (procaspasi), geni della fagocitosi (flippasi) e geni regolatori (Bcl-2, IAPs, Rip e Flip). Le caspasi presenti nel citosol si trovano allo stato inattivo: sono regolate da diverse famiglie di proteine IAPs, AIF (fattori inducenti l'apoptosi) e proteine della famiglia Bcl-2. L'attività dei geni che esprimono le proteine pro o antiapoptotiche può essere regolata da fattori di trascrizione. La p53 è un fattore di trascrizione espresso da un gene oncosoppressore; questa proteina in condizioni normali è poco espressa. È considerata il guardiano del genoma infatti quando il DNA viene danneggiato la p53 dopo attivazione (fosforilazione) ostacola la progressione del ciclo cellulare nella fase G1; tale sospensione dà alla cellula l'opportunità di riparare il danno del DNA; qualora questo non si realizzasse la p53 attiva il processo apoptotico attraverso un up-

regulation di recettori di morte (Fas), e di proteine proapoptotiche (Bad, Bax) ed una riduzione dell'espressione del gene che trascrive la proteina antiapoptotica Bcl-2; inoltre la p53 è in grado di legare Bcl-2 e Bcl-Xl questo consente a Bax o Bad di sganciarsi da Bcl-2 ed esercitare l'azione apoptotica. La mutazione del gene p53 che esprime la proteina mutata oltre a consentire la progressione incontrollata del ciclo cellulare consente la replicazione del DNA mutato. Il segnale apoptotico può essere inattivato da molecole citosoliche (Flip) queste avendo una struttura caspasi-like possono legarsi alle molecole adattatrici FADD impedendo alle procaspasi 8 di legarsi a FADD' cioè Flip costituisce un blocco del segnale apoptotico. La mancata produzione di Flip rende le cellule sensibili all'apoptosi. Alcuni virus sono capaci di sintetizzare un v-Flip inattivo che ne impedisce l'apoptosi permettendo così al virus di diffondersi.

Fattori di crescita - Possono antagonizzare l'apoptosi in parte attraverso l'attivazione di fattori di trasduzione quali Akt (fattore di sopravvivenza) che può inattivare per fosforilazione molecole proapoptotiche quali Bad; la fosforilazione di Bad impedisce sia la dimerizzazione di questa proteina che la dissociazione da Bcl-2 che può così svolgere la sua azione antiapoptotica prevenendo il rilascio del

citocromo c dai mitocondri; inoltre Akt -P può fosforilare la procaspasi 9 inibendola e al tempo stesso fosforilare IKK consentendo il rilascio di NFkB un fattore di trascrizione che attiva geni che codificano per proteine di sopravvivenza (IAP, Flip, Bcl-2). Un ruolo importante nel controllo apoptotico sono i fattori proteici di sopravvivenza (Bcl-2 etc) che combinandosi con APAF-1 impediscono a questo di legarsi al citocromo-c bloccando quindi la formazione dell'apoptosoma. Anche le Bcl-2 e Bcl-Xl possono essere fosforilate su residui di serina da chinasi (MAP chinasi) coinvolte in processi di traduzione di segnali. La fosforilazione di queste proteine riduce la loro affinità per APAF-1, facilitando la combinazione di quest'ultimo con il citocromo c e la procaspasi 9 con il risultato di un effetto pro-apoptotico. Fattori pro-apoptotici quali BIK e BH3 avendo elevata affinità con le Bcl-2 e Bcl-XL rimuovono quest'ultime dall'interazione con APAF-1 favorendo quindi la formazione dell'apoptosoma.

Capitolo 7: Fisiopatologia dei Radicali liberi

I radicali liberi sono specie chimiche (atomi o molecole) che possiedono uno o più elettroni spaiati negli orbitali esterni; tendono a sottrarre ad altre molecole elettroni per raggiungere una maggiore stabilità, pertanto sono dotate di grande reattività; la loro emivita è dell'ordine di millisecondi e reagiscono prevalentemente nel luogo di formazione fatta eccezione per alcuni come l'ossido di azoto che possono diffondere dalla cellula endoteliale alla fibrocellula della muscolatura liscia vasale; possono essere carichi positivamente, negativamente o neutri.

L'ossigeno indispensabile per la vita degli organismi aerobi, in particolari condizioni può diventare un pericoloso killer, tuttavia alcune specie reattive dell'ossigeno così come altre specie radicaliche possono svolgere un'azione fisiologica. L'ossigeno al ground-state è un biradicale con due elettroni spaiati e con spin paralleli; la maggior parte delle reazioni biologiche coinvolge il trasferimento o la condivisione di entrambi gli elettroni pertanto tale molecola è poco reattiva. Nella catena respiratoria mitocondriale il 98% dell'ossigeno è ridotto ad acqua dalla citocromo ossidasi che trasferisce contemporaneamente 4 elettroni all'ossigeno formando due molecole di acqua (Fig. 6) cioè l'ossigeno

nella catena respiratoria è solo un accettore finale di elettroni e non interviene direttamente nelle ossidazioni biologiche che avvengono per deidrogenazione. L'utilizzazione dell'ossigeno da parte degli organismi aerobi, paradossalmente, genera specie chimiche tossiche chiamate ROS (reactive oxygen species); una cellula produce una quantità di ROS pari a 33.10-11 mmol; i ROS possono essere generati in diversi distretti cellulari sia in condizioni fisiologiche sia in risposta a vari stimoli. Le maggiori fonti di ROS sono i mitocondri, il reticolo endoplasmatico, la membrana cellulare ed il citosol. Il trasporto degli elettroni lungo la catena mitocondriale, associata alla fosforilazione ossidativa, rappresenta la maggiore fonte cellulare di ATP; durante questo processo metabolico l'1-2% degli elettroni che fluiscono lungo la catena di trasporto, sfuggono dai complessi proteici ed interagendo con l'ossigeno, generano anione superossido soprattutto a livello dei Complessi I e III (Beyer R.E., 1992). L'anione superossido può inoltre generarsi anche nella matrice mitocondri per azione della MAO (Raha S. et al., 2000); nel citosol i ROS si possono generare dall'autossidazione dell'emoglobina, dall'attività di alcune ossidasi (aldeide-ossidasi, xantina-ossidasi), dall'autossidazione spontanea di flavine ridotte, di idrochinoni, di catecolamine, dalla NADPH ossidasi localizzata principalmente sul plasmalemma delle cellule fagocitiche e dalla biotrasformazione di sostanze xenobiotiche che coinvolge il citocromo P450. Queste specie

radicaliche sono in grado di danneggiare, con un meccanismo ossidativo, molecole biologiche come DNA, proteine, carboidrati e lipidi; la modificazione sul piano chimico di queste molecole ne altera la funzione. La cellula, tende a mantenere l'omeostasi dello stato redox in una pathway che coinvolge sistemi di salvaguardia sofisticati enzimatici e non; quest'ultimi possono essere idrofobici e idrofilo e agiscono con diversi meccanismi molecolari. Alcune molecole, note come "preventing antioxidants" (catalasi, glutazione perossidasi, glutazione ridottasi, glucosio-6-fosfato deidrogenasi) limitano la formazione dei radicali decomponendo l'acqua ossigenata e gli idroperossidi organici precursori di specie radicaliche o sequestrando ioni metallici che partecipano a reazioni redox (transferrina, ceruloplasmina, lattoferrina), altre molecole note come "free radical scavengers" eliminano i radicali via via che vengono prodotti con diversi meccanismi: a) inibendo l'iniziazione di una reazione radicalica (superossido dismutasi); b) interrompendo la propagazione (vitamina E, acido ascorbico, glutazione ridotto; c) formando un nuovo radicale meno reattivo e più stabile per risonanza elettronica (bioflavonoidi esogeni). Nella cellula esiste un equilibrio tra fattori pro-ossidanti (endogeni ed esogeni) e meccanismi di difesa atti a neutralizzarne gli effetti (Fig. 7). Un'alterazione di questo *balance*, che si

può verificare sia per un aumento di specie radicaliche e/o per una diminuzione dei meccanismi di difesa, innesca una serie di alterazioni metaboliche nel complesso note come "stress ossidativo"; questo è la risultante della interazione delle specie radicaliche con diverse macromolecole come lipidi, proteine e DNA. I radicali liberi giocano un ruolo chiave nell'eziopatogenesi di alcune patologie (aterosclerosi, catarattogenesi, neoplasie, fototossicità, invecchiamento cutaneo precoce, danni da riperfusione post-ischemica, patologie neurodegenerative e metaboliche).

Danni alle biomembrane - Sulle membrane cellulari, i ROS inducono la perossidazione dei fosfolipidi. Il processo consiste in una serie di reazioni a catena in cui gli acidi grassi insaturi dei fosfolipidi di membrana si trasformano progressivamente in radicali lipidici (L^{\cdot}), radicali perossilici (LOO^{\cdot}) e perossidi lipidici ($LOOH$); questi ultimi possono decomporsi facilmente in diverse specie quali alcossidi lipidici (LO^{\cdot}), aldeidi (malondialdeide), alcani, epossidi lipidici e alcool (Spiteller G., 2006); anche il colesterolo può subire modificazioni dello stesso tipo dando origine ad epossidi e alcool. In seguito a tali processi degenerativi, le membrane della cellula diventano rigide perdendo la fluidità e la funzione di permeabilità selettiva che le contraddistingue (Spiteller G., 2006).

Danni alle proteine - Per quanto riguarda le proteine, le reazioni ossidative indotte dai radicali liberi hanno come conseguenza la proteolisi o la loro aggregazione random. Esperimenti su proteine purificate hanno, infatti, dimostrato che le proprietà chimico-fisiche caratteristiche di una proteina esposta all'azione dei ROS sono completamente alterate. È stato osservato sia una diminuzione della fluorescenza nativa (dovuta a modificazione dei residui di Trp e Tyr) che una variazione del punto isoelettrico; inoltre, è stata dimostrata un'alterazione del peso molecolare dovuta alla formazione di legami intramolecolari o alla scissione della proteina in frammenti peptidici (Salo et al., 1990). L'effetto dei radicali liberi può essere diverso a seconda della concentrazione e della durata del "burst" ossidativo. Essi non devono sempre essere demonizzati infatti possono svolgere funzioni fisiologiche; sono coinvolti nel processo apoptotico, nell'attività microbica dei leucociti polimorfonucleati, nella regolazione del tono vasale. Negli ultimi anni è emerso che le specie radicaliche possono comportarsi da secondi messaggeri nella trasduzione ed amplificazione del segnale di ligandi; nella cellula questo pathway coinvolge la fosforilazione e defosforilazione di alcune proteine redox sensibili compresi alcuni fattori di trascrizione. Le specie radicaliche modulando l'ambiente redox della cellula possono regolare questo sofisticato meccanismo molecolare cioè l'ambiente redox è in grado di determinare il destino di una cellula se questa deve proliferare, differenziarsi o morire

per apoptosi. L'apoptosi, così come il passaggio dalla fase G1 a quella S del ciclo cellulare richiedono un ambiente proossidante infatti agenti riducenti come la N-acetil-cisteina (NAC) riducono questi eventi molecolari. L'attivazione della tioredoxina e l'inibizione del fattore di trascrizione NFκB sono regolati dall'NO attraverso reazioni di S-nitrosilazione.

Capitolo 8: Aspetti nutrizionali e cancro

Studi epidemiologici supportati da dati sperimentali clinici *in vitro* ed *in vivo* hanno contribuito ad individuare il potenziale legame tra la dieta, intesa come apporto giornaliero di fattori nutrizionali quali carboidrati, lipidi, proteine, vitamine e oligoelementi, ed insorgenza e/o la prevenzione di patologie neoplastiche (Chen J. et al. 2010).

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

A sostegno del fatto che la dieta influisca notevolmente sullo

sviluppo e/o sulla prevenzione di malattie neoplastiche sopraggiungono anche le significative differenze percentuali che riguardano l'insorgenza di cancro tra le popolazioni indigene e gli emigranti; ad esempio, 4 nigeriani trapiantati negli Stati Uniti presentano una maggiore incidenza del tumore al colon rispetto alla popolazione del paese di origine, questo suggerisce che oltre ai fattori genetici anche quelli ambientali e nutrizionali possano essere determinanti nella variazione del tasso di comparsa di tali malattie. Alcuni dati epidemiologici evidenziano una correlazione diretta tra lo sviluppo dei tumori più diffusi, come il cancro del colon-retto, del rene, della prostata, della vescica, del fegato, e l'assunzione di particolari principi nutrizionali quali grassi di origine animale, contenenti elevata quantità di acidi grassi saturi e colesterolo; per contro ulteriori studi evidenziano una correlazione inversa tra l'assunzione di verdura, alimenti ricchi in fibre, frutta, cereali e il rischio di sviluppare neoplasie (James M.A. et al., 2010; Kumar R. et al., 2010; Diaz-Laviada I., 2010; Hsieh T.C. et al., 2010). La funzione di alimenti, noti come **functional food**, è quella di fornire, ad ogni singola cellula, molecole contro il danno ossidativo; tuttavia le proprietà anticancerogene di alcuni alimenti di origine vegetale non sono da imputare solo al loro contenuto di antiossidanti ma anche alla presenza di composti chimicamente diversi (acidi grassi polinsaturi, omega-3) in grado di regolare il segnale di traduzione e la progressione del ciclo cellulare (Hsieh T.C., et al., 2010; Veeraraghavan J. et al., 2010). Sono

numerosi gli studi che testano i livelli di assunzione di lipidi, con distinzione per quantità (grassi totali) origine (animale o vegetale) e tipo (saturi, monoinsaturi e poliinsaturi) e l'insorgenza di patologie cancerose. Esperimenti *in vivo* su ratto hanno evidenziato che modificando la composizione dei grassi assunti dalla dieta è possibile alterare la percentuale di comparsa di tumori e disporre di una diversa suscettibilità ad essi. Alle stesse conclusioni si giunge analizzando i dati ricavati da studi di popolazione condotti su scala internazionale che hanno come oggetto l'analisi dell'insorgenza di patologie tumorali in relazione al consumo di grassi pro-capite. I lipidi assunti tramite la dieta non sono solo studiati come possibili induttori del programma di carcinogenesi ma, dai dati di recente letteratura, sembra sempre più valida la teoria che alcuni tipi di acidi grassi polinsaturi, come gli omega 3, abbiano la capacità di regolare la proliferazione cellulare. Il ruolo che tali molecole rivestono nell'eziologia di malattie cancerose è stato evidenziato da numerosi studi *in vitro* ed *in vivo* che dimostrano come essi limitino lo sviluppo e/o inibiscano la crescita delle più comuni forme di patologie neoplastiche presentando proprietà preventive e soppressive nei confronti di tali patologie, rispetto ad altri tipi di acidi grassi o composti appartenenti alla stessa famiglia.

Capitolo 9: Scopo del lavoro

In Italia, nell'ultimo secolo, l'aspettativa di vita (lifespan) è notevolmente aumentata; questa per gli uomini è di 79 anni mentre per le donne è di 84; tuttavia la qualità della vita (healthspan) è diminuita infatti è aumentato il numero di persone affette da patologie come obesità, ipertensione, diabete, ipercolesterolemia, sindrome metabolica, patologie cerebrocardiovascolari, tumori ed Alzheimer.

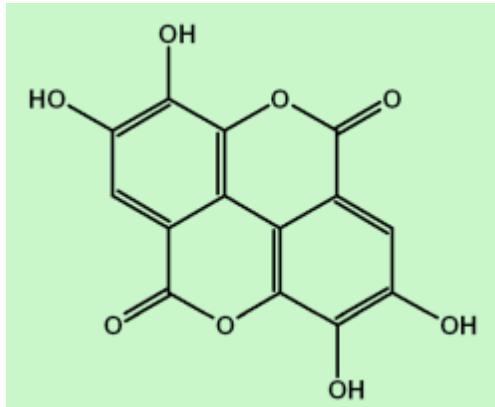
Una alimentazione non corretta ed non equilibrata, una carenza di attività fisica, l'assunzione di sostanze tossiche hanno un ruolo chiave nel promuovere queste patologie. I fattori di rischio legati allo stile di vita concorrono ad influenzare negativamente la lifespan e piu' ancora la healthspan del singolo individuo. La presenza di alimenti funzionali, in una alimentazione corretta ed equilibrata, riduce il rischio di alcune patologie metaboliche e degenerative. L'interesse sugli effetti protettivi esercitati “*in vivo*” da antiossidanti naturali quali i polifenoli contenuti nella dieta, contro il danno ossidativo indotto dai radicali liberi dell'ossigeno, è sempre maggiore.

Lo stress ossidativo è uno dei fattori coinvolti nell'eziopatogenesi di numerose patologie (diabete, patologie neurodegenerative, aterosclerosi, cancro); numerosi dati epidemiologici suggeriscono che il consumo di

antiossidanti naturali contenuti nella dieta può ridurre il rischio di contrarre tali patologie (Veeraraghavan J., 2010; Hsieh T.C et al., 2010; James M.A., et al., 2010).

Il melograno (*Punica granatum* L.) è una pianta originaria dell'Africa settentrionale e dei monti del Caucaso, largamente diffusa anche in tutto il Nord America. Gli usi tradizionali del melograno hanno radici molto antiche; il melograno è descritto in un papiro datato addirittura 1550 anni prima di Cristo (papiro di Ebers). Anche Ippocrate ne descrive le proprietà e parla del melograno come di un vero e proprio rimedio medicamentoso. Nell'antica Grecia il melograno era prescritto come antielmintico, antinfiammatorio e per combattere i casi di diarrea cronica. Nella medicina tradizionale georgiana, invece, il melograno veniva utilizzato per la cura di emorragie, ferite infette e sudori notturni. Diffuse erano anche le applicazioni contro le infezioni parassitarie.

Le proprietà benefiche attribuibili al melograno sono per la maggior parte collegabili al suo contenuto in polifenoli, in particolar modo all'*acido ellagico*. È stato recentemente dimostrato che l'acido ellagico ha proprietà antiossidanti, antibatteriche ed anticancerogene (Hagiwara Y. et al., 2010; Dai Z. et al., 2010).



Acido Ellagico

L'epitelio prostatico dell'uomo deriva da una unica popolazione di "stem cells" che dà origine a due tipi di cellule intermedie; le cellule $K5^{++}/K18^{+}$, da cui prenderanno origine le cellule del compartimento basale; le cellule $K5^{+}/K18^{++}$ da cui prenderanno origine le cellule luminali (Wagner D.G. et al., 2007). Queste ultime si differenziano ulteriormente assumendo caratteristiche esocrine o neuroendocrine (Fig. 8) (Sant'Agnese P.A. 2001; Wu C.Y, et al., 2006; Huang J. et al., 2007). L'attività esocrina è limitata all'epitelio luminale che secerne il liquido prostatico ricco di Antigene Prostatico Specifico (PSA). L'adenocarcinoma prostatico è caratterizzato da una trasformazione maligna dell'epitelio luminale in assenza di cellule basali. Le cellule intermedie $K5^{+}/K18^{++}$ mantengono la capacità di differenziarsi in cellule

esocrine e neuroendocrine. Tuttavia nei tumori prostatici androgeno-dipendenti (non metastatici) si mette maggiormente in evidenza una proliferazione di cellule esocrine, mentre in quelli androgeno-indipendenti (metastatici) aumenta la proliferazione delle cellule neuroendocrine (Fig. 9) (Wu C.Y, et al., 2006).

Le linee cellulari di carcinoma prostatico servono come modello di indagine sulla progressione tumorale, invasività delle metastasi, farmaco-resistenza, farmacosensibilità, chemioprevenzione e nuove strategie terapeutiche. Recentemente sono state allestite linee cellulari epiteliali di tumore prostatico umano quali le cellule LnCap (che derivano da un linfonodo e rappresentano un grado iniziale di invasività) e le cellule DU145 (che derivano da una lesione cerebrale e che rappresentano un grado avanzato di invasività) che hanno largamente contribuito alle attuali conoscenze biomolecolari del cancro prostatico.

Scopo della presente ricerca è stato quello di valutare una possibile capacità citodifferenziante dell'*acido ellagico* in linee cellulari di tumore prostatico (cellule LnCap e cellule DU145). Come controllo non tumorale sono state utilizzate cellule BPH-1 (ipertrofia prostatica benigna). Per valutare le concentrazioni efficaci di acido ellagico è stato eseguito il test di vitalità cellulare (MTT test). Tecniche di

immunocitochimica sono state eseguite per valutare i livelli di espressione di una glicoproteina acida idrofila, presente nei granuli cromaffini delle cellule neuroendocrine nota come Cromogranina A (marker di differenziamento neuroendocrino) (Yu D.S. et al., 2003) e di p75NGFR (glicoproteina di 75 KDa presente nell'epitelio prostatico normale ma non in quello tumorale). Inoltre sono state valutate i livelli dell'attività della lattico deidrogenasi (LDH), dei livelli di ROS e l'espressione delle proteine DNA-metiltransferasi-1, pRB, p53, p21 e caspasi-3 in presenza ed in assenza di acido ellagico a differenti concentrazioni.

Capitolo 10 : Materiali e metodi

Negli esperimenti sono state utilizzate tre differenti linee cellulari prostatiche a diverso grado di invasività. BPH-1 (ipertrofia prostatica benigna), LnCap (metastasi di linfonodi sovraclavicolari, androgeno dipendente) e DU145 (metastasi cerebrali, androgeno indipendente) (Fig. 10). Le cellule BPH-1 sono state coltivate in medium RPMI 1640 (Sigma) supplementato con *fetal calf serum* al 20%, streptomicina-penicillina all'1%, testosterone 20 ng/ml, transferrina 5 µg/ml, sodio selenite 5 ng/ml, insulina 5 µg/ml. Le cellule LnCap sono state coltivate in medium RPMI 1640 (Sigma) supplementato con *fetal calf serum* al 10%, streptomicina-penicillina all'1%, glutammina all'1%, sodio piruvato all'1% e glucosio all'1%. Le cellule DU145 sono state coltivate in medium DMEM supplementato con *fetal calf serum* al 10%, streptomicina-penicillina all'1%, glutammina all'1%, amminoacidi non essenziali all'1% in atmosfera di CO₂ al 5% a 37°C.

Le cellule BPH-1, DU145, LnCap sono state piastrate e dopo 24h alcuni dishes sono stati pretrattati per 48h con diverse concentrazioni di acido ellagico (4,5-9-18-37-75-150-300 µM) quindi sono staccate con tripsina EDTA (Gibco BRL) ed utilizzate per effettuare i seguenti saggi:

- MTT test;
- Metodo immunocitochimico per la Cromogranina A e per la p75NGFR;
- Western blotting per l'espressione delle seguenti proteine: caspasi-3, p53, p21, DNA metiltransferasi (DNAMT-1) e pRb;
- LDH release;
- Determinazione dei ROS.

MTT test

La vitalità cellulare è stata misurata attraverso il saggio colorimetrico ai Sali di tetrazolio. Tale saggio presuppone la totale integrità delle cellule e valuta la capacità che hanno le cellule di ridurre, per mezzo della succinato deidrogenasi mitocondriale, il bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) (Acquaviva R. et al., 2004). L'MTT entra nelle cellule e successivamente nei mitocondri dove viene ridotto in un prodotto colorato ed insolubile noto come formazano. Per rendere visibile il suo colore si solubilizzano i granuli colorati tramite l'aggiunta di DMSO; il livello di formazano presente è utilizzato come indice indiretto della densità cellulare. Dopo incubazione delle cellule per 3h, in 5% CO₂ a 37°C, con 20 µl della soluzione del sale di tetrazolio (5mg/ml),

è stato rimosso il sovrantante e sono stati aggiunti 100 µl di DMSO; successivamente è stata misurata la densità ottica (O.D.) ad una lunghezza d'onda di 570 nm con uno spettrofotometro per micropiastre (Titertek Multiscan, Flow Laboratories); per ogni campione sono state effettuate prove in triplo. La vitalità cellulare viene espressa come percentuale di densità ottica rispetto al controllo non trattato. Per gli altri tests sono state scelte le concentrazioni 25-50-100 µM di acido ellagico.

Immunocitochimica

Per l'esecuzione dell'immunocitochimica le cellule sono state transfettate su piastre da 12 pozzetti nelle quali sono stati posti preventivamente dei vetrini coprioggetto pretrattati con collagene; dopo i vari trattamenti le cellule sono state fissate per 20 minuti con una soluzione di paraformaldeide al 20%; dopo tre lavaggi con tampone fosfato (PBS), le cellule sono state permeabilizzate per 10 minuti con una soluzione di PBS e di TRITON 100x (PTX 0,2%) e tenute per un'ora in *blocking buffer* (PTX 0,2% e Normal goat Serum, NGS 5%). Successivamente i vetrini coprioggetto sono stati incubati "over night" a 4°C rispettivamente con anticorpo monoclonale primario anti-Cromogranina A (diluizione 1:200) o con anticorpo monoclonale anti p75NGFR (diluizione 1:200). In alcuni

campioni di cellule non trattate, utilizzati come controllo negativo, l'anticorpo primario è stato sostituito con tampone fosfato ed incubato "over night" a 4°C contemporaneamente ai campioni da analizzare. Trascorso il tempo di incubazione le cellule sono state sottoposte a lavaggi con PBS ed incubate per 30 minuti con un anticorpo secondario fluorescente (coniugato con fluoresceina isotiocianato FITC). Effettuati i lavaggi con PBS, i vetrini sono stati montati su vetrini portaoggetto con una soluzione di PBS/glicerolo (1:1). L'osservazione delle cellule è stata effettuata mediante microscopio a fluorescenza Polyvar Reicheter, corredato di macchina fotografica e di filtri specifici per l'osservazione in FITC.

Rilascio di lattico deidrogenasi

La citotossicità indotta dal trattamento con acido ellagico a diverse concentrazioni (25-50-100 μM) è stata valutata misurando la percentuale di lattico deidrogenasi (LDH) rilasciata nel medium di coltura rispetto alla quantità di LDH totale, come riportato da Acquaviva R. (Acquaviva R. et al., 2004). Il medium è stato prelevato e centrifugato a 800 x g per 10 minuti. Il pellet ottenuto è stato risospeso in 500 μl di digitonina (2,5 mg/ml) ed aggiunto al dish corrispondente, contenente altri 500 μl di

digitonina. Il surnatante (medium) ottenuto dalla centrifugazione è stato utilizzato per il dosaggio del release della LDH. Le cellule nei dishes, trattate con digitonina, dopo incubazione a 4°C per 1h sono state raccolte, centrifugate a 10.000 x g per 15 minuti e il surnatante usato per il dosaggio della LDH endocellulare. La quantità di LDH rilasciata è stata espressa come percentuale di LDH rilasciata rispetto alla quantità totale.

Determinazione delle specie radicaliche dell'ossigeno (ROS)

Per la determinazione dei ROS è stato impiegata la diclorofluoresceina diacetato (DCFH-DA) non fluorescente (Russo A. et al., 2005). In presenza di ROS, la DCFH-DA si idrolizza e diossida a DCF, molecola altamente fluorescente (Russo A. et al., 2005). L'intensità della fluorescenza intracellulare della DCF può essere utilizzata come indice per quantificare le specie ossidanti presenti nella cellula. L'intensità di fluorescenza è stata monitorata utilizzando un fluorimetro Hitachi a $\lambda_{Ex} = 485 \text{ nm}$ e $\lambda_{E} = 530 \text{ nm}$. I risultati sono espressi come intensità di fluorescenza/mg di proteine.

Western Blotting

I livelli di espressione di caspasi-3, p53, p21, p-Rb, DNAMT-1 sono stati misurati mediante la tecnica western blotting; a tal fine le tre linee cellulari BPH-1, LnCap e DU145 sono state messe in coltura su tre fiasche da 75cm²; quando le cellule hanno raggiunto circa il 70-80% di confluenza sono state staccate con 2 ml di Tripsina-EDTA e raccolte in tubi da 15 ml, la tripsina aggiunta è stata inattivata con 5 ml di terreno di coltura quindi la sospensione cellulare è stata centrifugata a 2000 rpm per 10 minuti a 4°C. Il pellet cellulare è stato quindi risospeso con 100 µl di tampone di raccolta (Tris-base 25mM, NaCl 100mM, 3-beta-mercaptoetanololo 7mM pH 8,3) contenente un insieme di inibitori delle proteasi Sigma-Aldrich[®] (pestatina A, 4-(2-amminoetil) benzensulfonilfluoruro E64, bestatina, leupeptina, aprotinina) in rapporto 1:1000. Aliquote corrispondenti a 50 µg di proteine, dosate con il metodo Bradford (Bradford M.M., 1979), sono state sottoposte ad elettroforesi su SDS-PAGE (10% Acrilammide mix, 100 Volt); il *running buffer* utilizzato è un tampone costituito da Tris-base 5 mM, glicina 50mM e sodio dodecilsolfato (SDS) 0,02% p/v. Dopo la corsa elettroforetica i gels sono stati "trasferiti" su membrana di nitrocellulosa Amersham[®] per 4 h utilizzando Submerge Westen Blot Biorad[®] a 63 mA, usando un *transfer buffer* contenente glicina 150 mM, Tris-base 20 mM, SDS 0.02% e

metanolo 20% v/v. Completato il trasferimento le membrane sono state immerse per 2 ore in 50 ml di *Blocking*, costituita da *not fat dried* milk al 5% disciolto in tampone TBST (100 NaCl mM, Tris-base 10 mM, Tween 20 0.1 % v/v). L'incubazione con l'anticorpo primario specifico è stata eseguita "over night"; successivamente è stata eseguita ibridazione con anticorpo secondario (1:2000) *horseradish* coniugato alla perossidasi. I livelli di espressione sono stati quindi evidenziati mediante esposizione su lastre autoradiografiche, usando come kit di rivelazione l'ECL plus (Amersham®). I risultati ottenuti sono espressi come UDA (Unità Densitometriche Arbitrarie) e normalizzate con la tubulina.

Capitolo 11: Risultati e Discussioni

I risultati conseguiti mediante il saggio ai sali di tetrazolio (MTT test) mettono in evidenza che l'acido ellagico in maniera dose-dipendente è in grado di ridurre la vitalità cellulare (Fig. 11); per gli esperimenti successivi sono state scelte le seguenti concentrazioni di acido ellagico 25-50-100 mM. I livelli di espressione del neuropeptide Cromogranina A sono significativamente più elevati nelle linee tumorali LnCap e DU145 rispetto alle cellule non tumorali BPH-1 (Fig. 12). Il trattamento con acido ellagico riduce in maniera dose dipendente i livelli di espressione di Cromogranina A nelle due linee tumorali. Tuttavia tale riduzione potrebbe essere messa in relazione con la diminuzione del numero di cellule piuttosto che con un possibile citodifferenziamento. I livelli di espressione della glicoproteina p75NGFR sono significativamente più bassi nelle linee tumorali rispetto alle cellule non tumorali BPH-1 (Fig. 13). Il trattamento con acido ellagico determina un aumento dose dipendente dei livelli di espressione di tale glicoproteina nelle linee cellulari tumorali. Tali risultati avvalorano l'ipotesi che l'acido ellagico possa esercitare un effetto citodifferenziante promovendo la conversione delle cellule tumorali in cellule "Normal-Like". Per meglio

comprendere i meccanismi molecolari coinvolti nell'attività antitumorale dell'acido ellagico sono stati valutati i livelli di espressione di proteine coinvolte nel ciclo cellulare e nel processo di apoptosi. La metilazione del DNA, catalizzata dall'enzima *DNA metiltransferasi (DNMT)*, è considerata una modificazione post-replicativa del DNA. Tale processo è coinvolto nell'attivazione di pro-oncogene. La metilazione interessa sequenze CpG note come "Isole CpG" localizzate nei promotori dei geni costitutivi (Di Croce L. et al., 2002). I fenomeni epigenetici, come la metilazione del DNA, alterano l'accessibilità al genoma di molecole che regolano l'espressione genica. I tumori sono caratterizzati da una disattivazione di alcuni geni preposti al normale differenziamento cellulare e da una disattivazione di geni oncosoppressori con conseguente attivazione di alcuni pro-oncogene. Questa disattivazione è mediata da reazioni di metilazione che interessano particolari siti promotori. In assenza di acido ellagico livelli di espressione della proteina DNMT-1 risultano particolarmente elevati nelle cellule tumorali DU145 ed LnCap rispetto alle cellule non tumorali BPH-1. Il trattamento con acido ellagico nelle cellule DU145 ed LnCap riduce in maniera dose dipendente i livelli di espressione di tale proteina. Tali risultati indicano una possibile attività antitumorale dell'acido

ellagico (Fig 14). Un'altra proteina nota come pRb svolge un ruolo chiave nella regolazione del ciclo cellulare. La pRb promuove il ciclo cellulare quando è fosforilata mentre quando è defosforilata lo inibisce. La fosforilazione è catalizzata, alla fine della fase G1, da un complesso CdK/4/6/ciclinaD per essere poi defosforilata alla fine della mitosi. Alla forma non fosforilata è legato un fattore di trascrizione noto come E2F questo link impedisce al fattore di trascrizione di svolgere la sua azione. Quando la pRb viene fosforilata rilascia il fattore di trascrizione che attiva alcuni geni essenziali per la progressione del ciclo (fase S). Nelle linee cellulari DU145 ed LnCap i livelli di espressione della proteina p-Rb sono particolarmente elevati mentre nelle cellule BPH-1 non è evidenziabile l'espressione di tale proteina. L'attività antitumorale dell'acido ellagico è evidenziata dalla sua capacità di ridurre in maniera dose dipendente l'espressione della proteina p-Rb sia nelle cellule DU145 che nelle cellule LnCap (Fig. 15). Il trattamento con acido ellagico non induce modificazioni nell'espressione della proteina p53 nelle linee BPH-1, DU-145 e LnCap tuttavia una overespressione si osserva nelle cellule BPH-1 (Fig. 16). La proteina p21 non è espressa nella linea DU145 perchè è assente il gene mentre questa è espressa nella linea LnCap ed aumenta in maniera dose dipendente dopo

trattamento con acido ellagico (Fig. 17). Il clivaggio e quindi l'attivazione della caspasi 3 si evidenzia solamente nelle DU145 quando queste sono sottoposte a trattamento con acido ellagico 50 e 100 μ M (Fig. 18). Nella figura 19 sono riportati i valori relativi alla percentuale di rilascio di lattico deidrogenasi nel medium di coltura. Nessuna variazione significativa è messa in evidenza in seguito al trattamento con acido ellagico ad eccezione delle DU145 quando queste sono trattate con acido ellagico 100 μ M. Nella figura 20 sono riportati i livelli di ROS intracellulari; i valori, espressi come intensità di fluorescenza/mg proteine, sono significativamente più bassi nelle cellule DU145 rispetto a quelli riscontrati nelle cellule LnCap e questi ultimi più bassi rispetto ai valori riscontrati nelle cellule BPH1. Il trattamento con acido ellagico determina una riduzione dose-dipendente del rilascio di ROS nelle cellule DU145, un moderato aumento nelle cellule LnCap e nessuna variazione nelle cellule BPH-1. I risultati conseguiti nella presente ricerca confermano che l'acido ellagico è in grado di indurre morte per apoptosi piuttosto che per necrosi. Infatti la valutazione della percentuale di rilascio di LDH, non mette in evidenza significative variazioni in seguito al trattamento con acido ellagico. E' stato recentemente dimostrato (Lim H. W. et al.,

2005) che in cellule tumorali di prostata sono presenti bassi livelli di ROS, anche in presenza di agenti stressanti; questo è dovuto all'up-regulation di sistemi di difesa antiossidante, quali catalasi, glutatione reduttasi, glutatione ecc. Valori bassi di ROS ed elevati livelli di sistemi antiossidanti, possono spiegare la resistenza delle cellule tumorali rispetto alle cellule normali. I risultati conseguiti nella presente ricerca evidenziano che i valori più bassi di ROS sono riscontrabili nelle cellule DU145 nelle quali l'acido ellagico non è in grado di indurre un aumento; un moderato incremento si evidenzia nelle cellule LnCap, mentre nessuna variazione si osserva nelle cellule BPH-1. I meccanismi molecolari dell'attività antitumorale dell'acido ellagico possono essere spiegati dalla sua capacità di indurre apoptosi per attivazione della proteina p53 che nelle cellule DU-145 porta a clivaggio della caspasi 3 mentre nelle cellule LnCap porta al blocco del ciclo cellulare per attivazione della proteina p21; pertanto l'attività antitumorale nelle diverse linee cellulari può realizzarsi attraverso vie alternative che conducono alla morte cellulare. Inoltre l'acido ellagico promuovendo il citodifferenziamento consente alla popolazione cellulare che rimane vitale di avere un fenotipo *normal-like*. L'utilizzo

di "functional food" riduce il rischio di molte patologie; questo è il messaggio che bisogna trasmettere alle generazioni future.

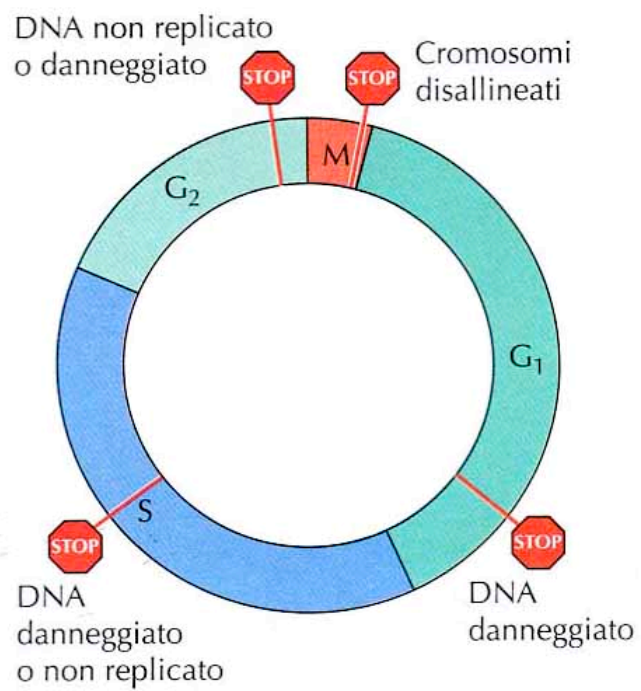
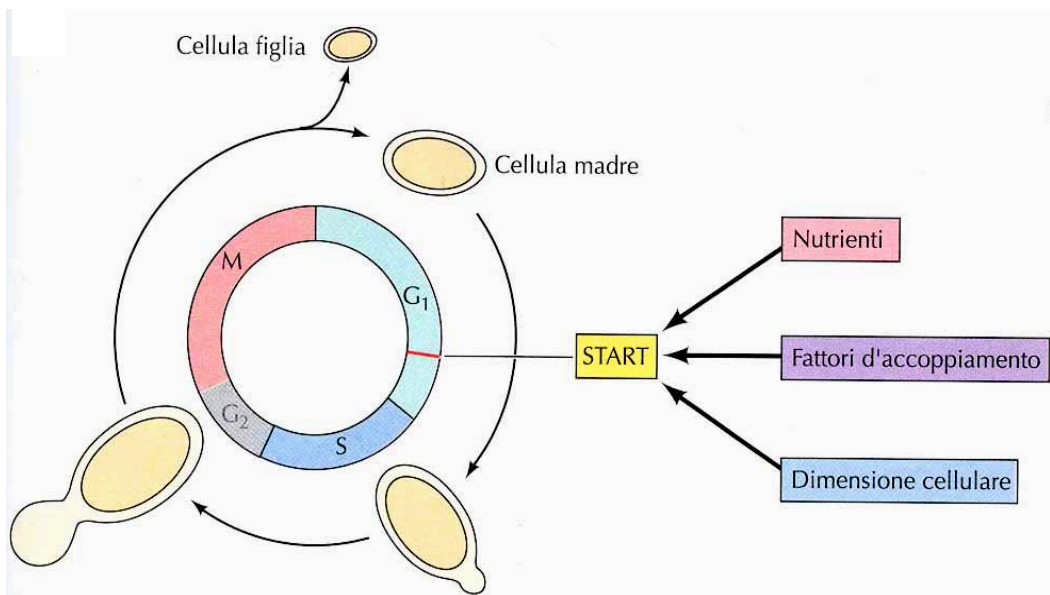


Fig. 1: Fasi del ciclo cellulare e check points

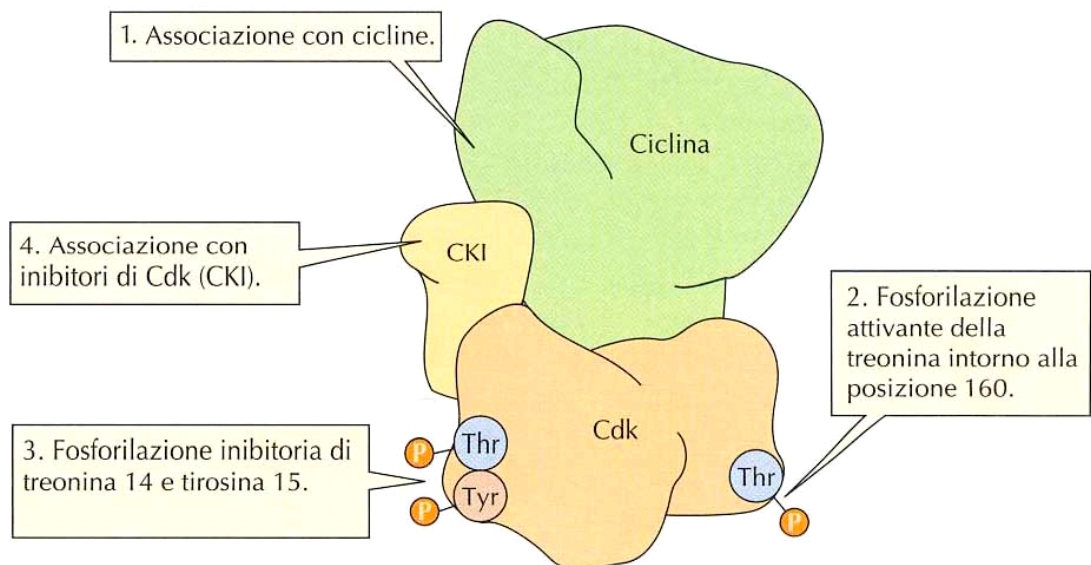


Fig. 2: Regolazione del complesso cicline/CdK

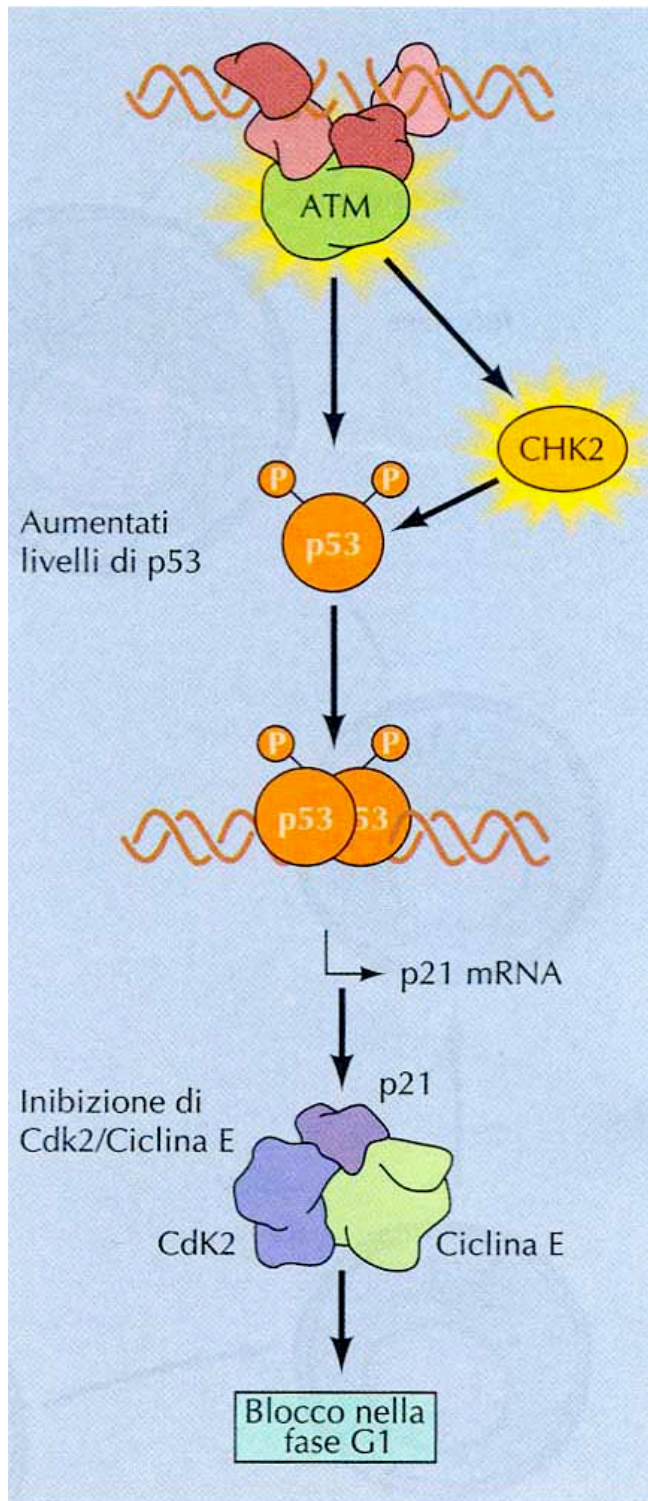


Fig. 3: Ruolo di p53 nel blocco della fase G1

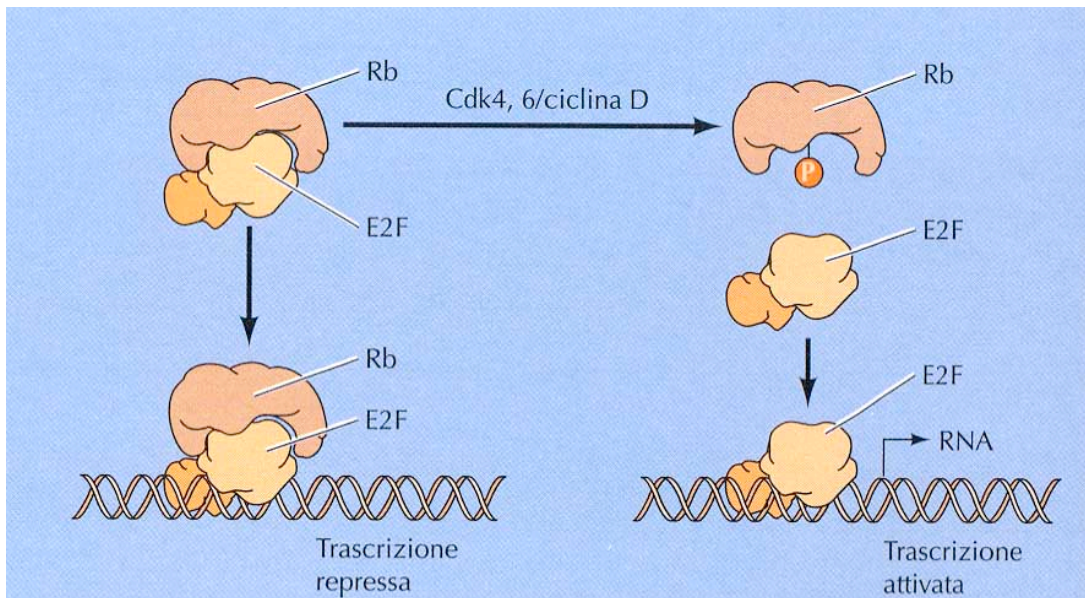


Fig. 4: Regolazione del ciclo cellulare di Rb ed E2F

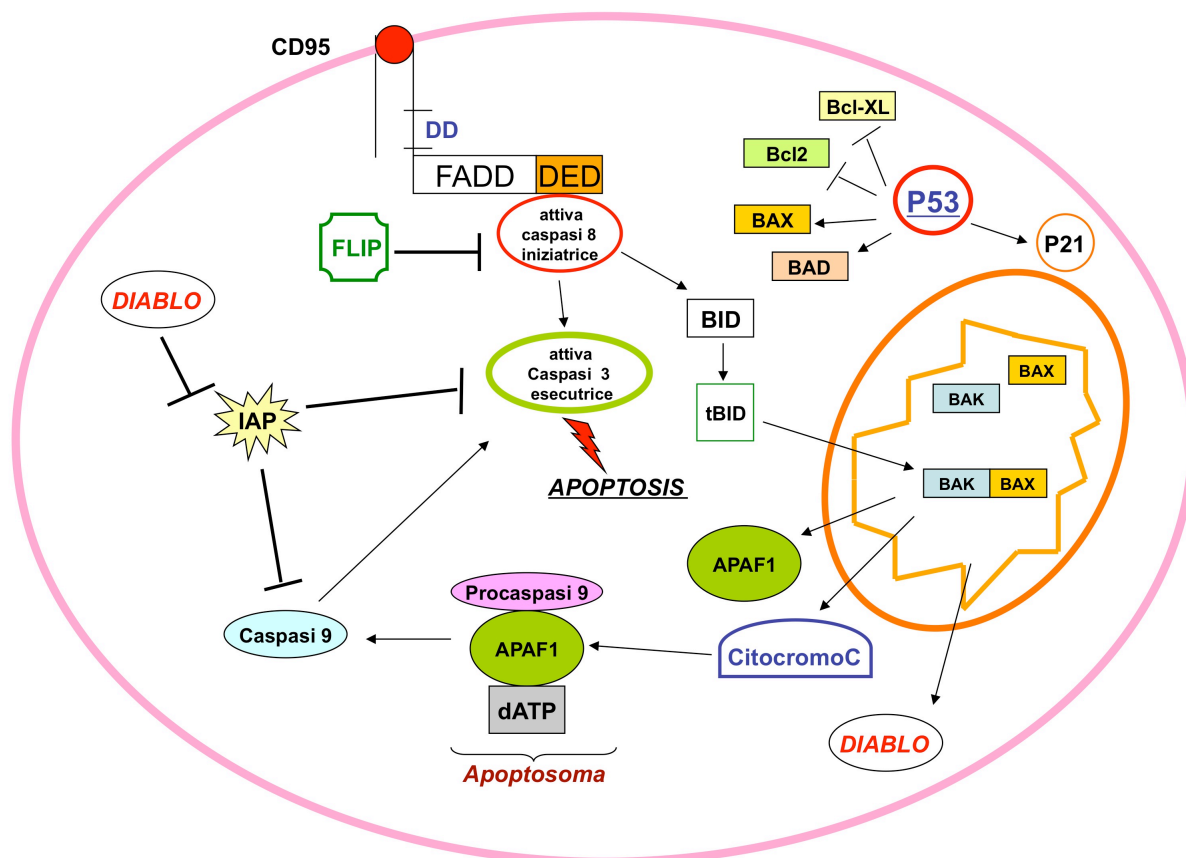


Fig. 5: Apoptosi: meccasismi molecolari

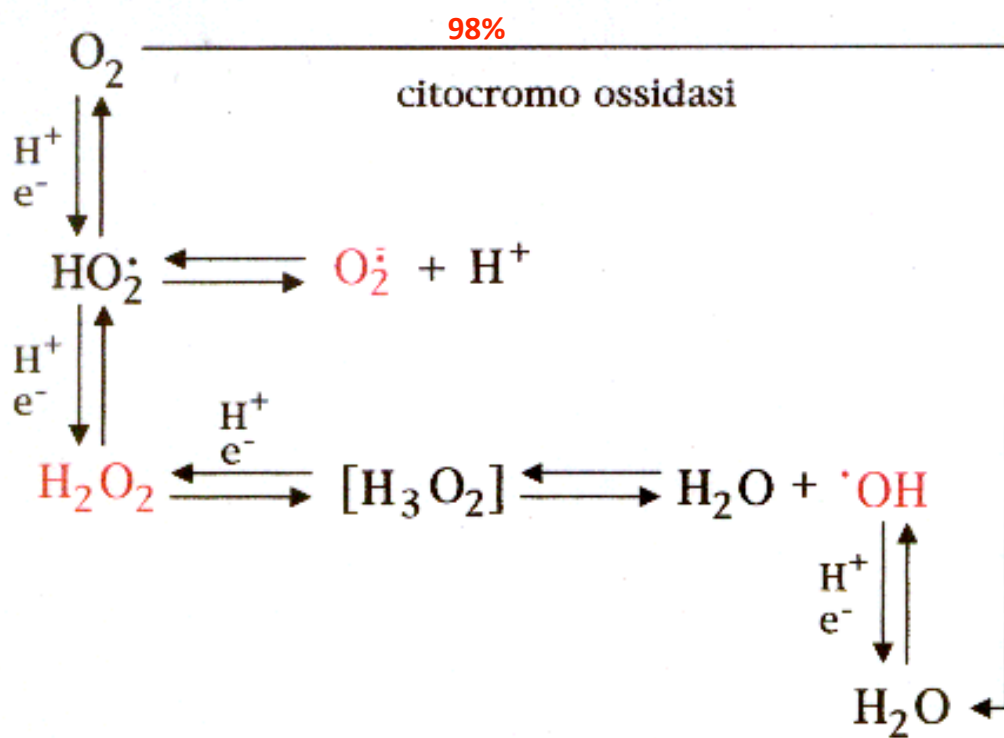


Fig. 6: Riduzione dell'ossigeno molecolare nella catena respiratoria mitocondriale

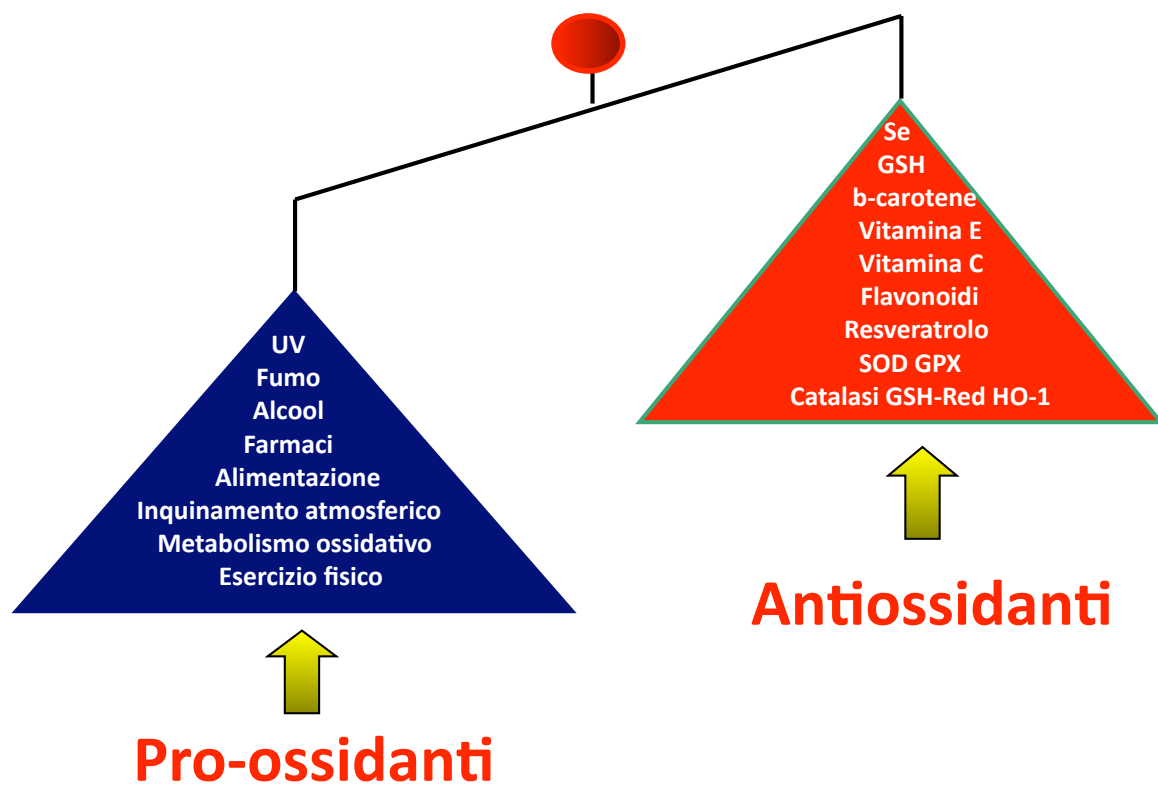


Fig. 7: Omeostasi dello stato redox

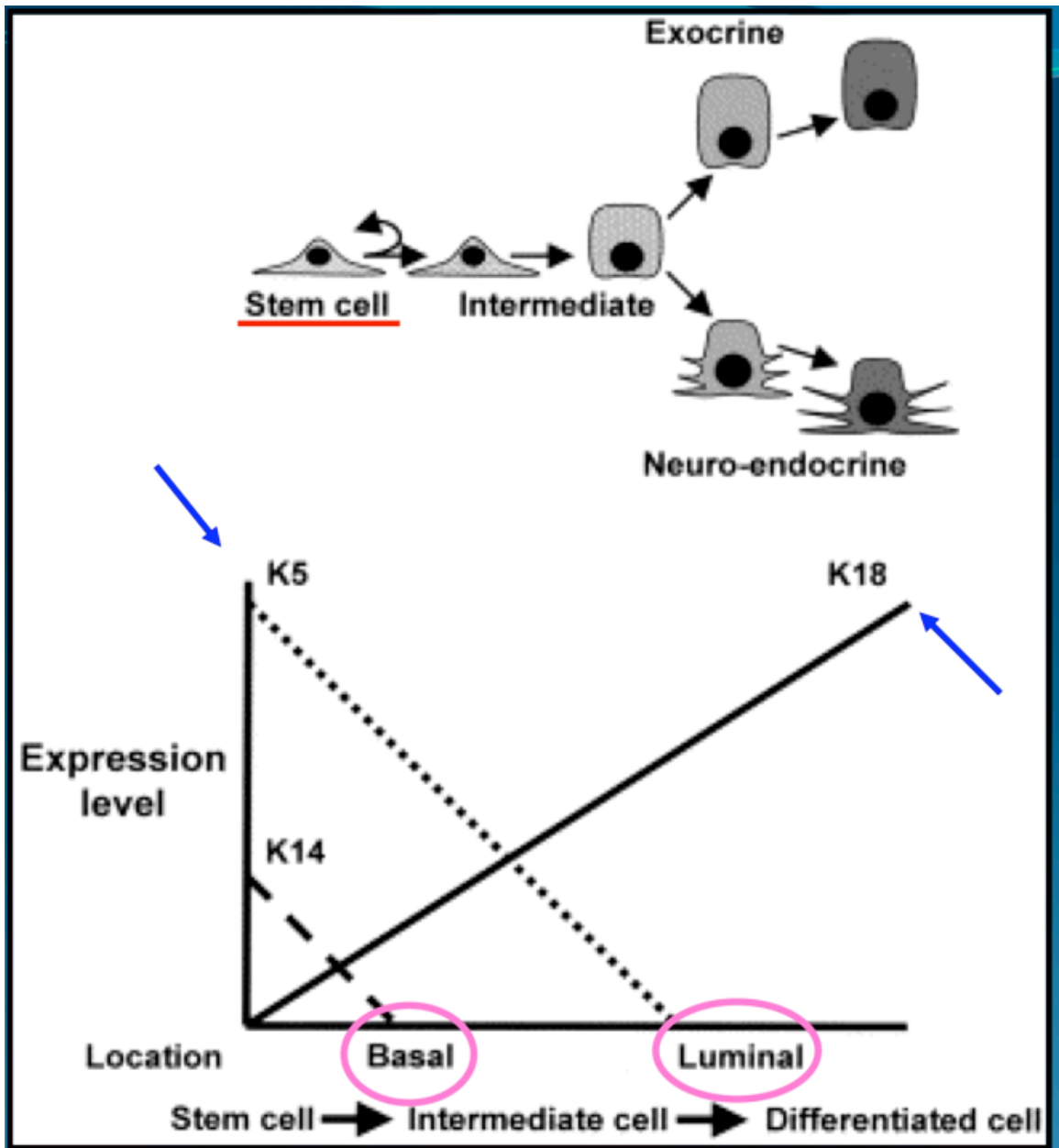


Fig. 8: L'epitelio prostatico deriva da una unica popolazione di stem cells da cui prendono origine due tipi di cellule intermedie: $K5^+/K18^+$ (cellule basali) e $K5^+/K18^{++}$ (cellule luminali). Queste ultime si differenziano in cellule esocrine o in cellule neuroendocrine.

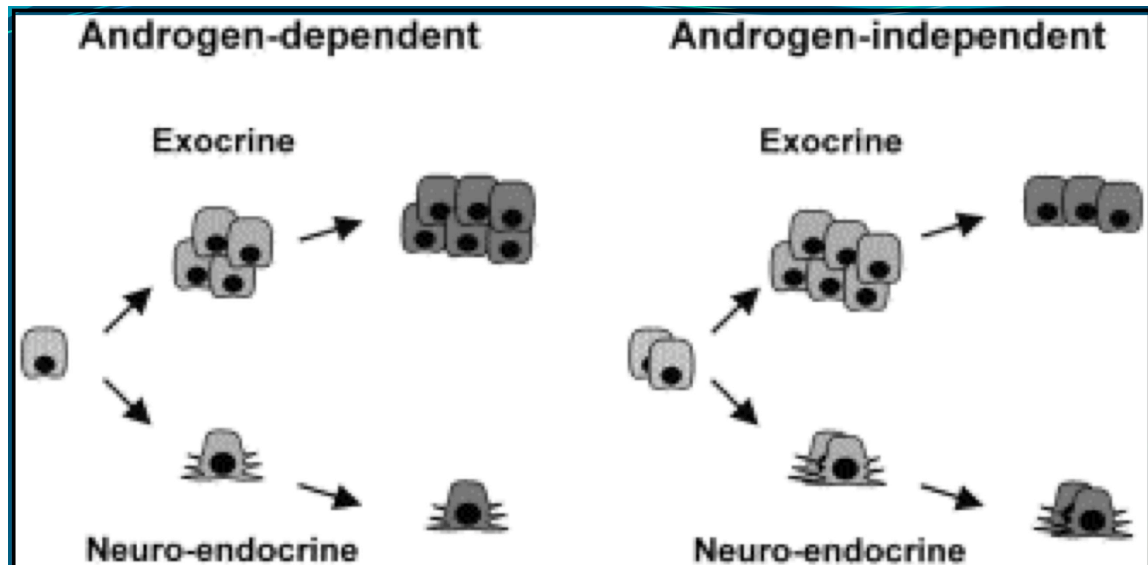
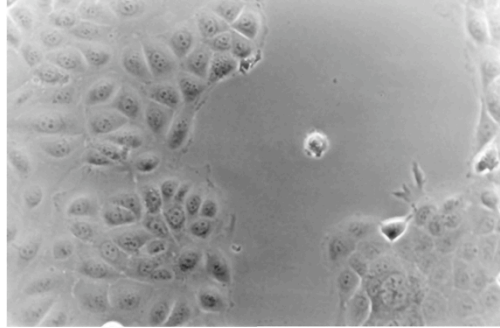
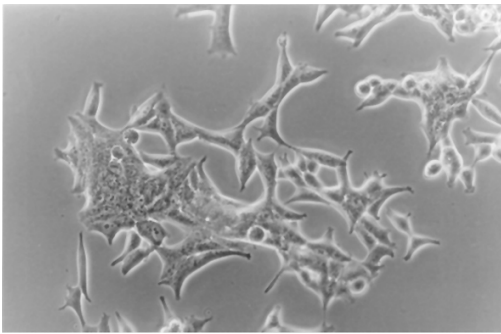


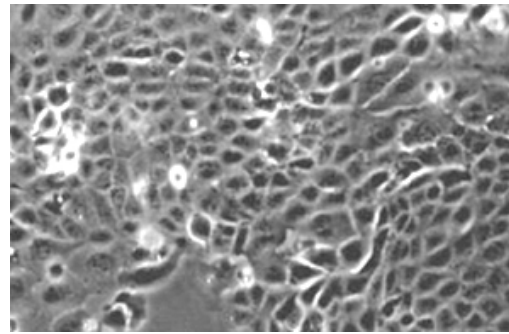
Fig. 9: L'adenocarcinoma prostatico deriva da una trasformazione maligna dell'epitelio luminale. Nella fase iniziale è un tumore androgeno dipendente (caratterizzato da un elevato numero di cellule esocrine); nel tempo il tumore tende a trasformarsi in una forma ormone indipendente (caratterizzato da un elevato numero di cellule neuroendocrine)



BPH-1



LnCap



DU145

Fig. 10: **BPH-1** (ipertrofia prostatica benigna); **LnCap** (metastasi di linfonodi sovraclavicolari, androgeno dipendente); **DU145** (metastasi cerebrali, androgeno indipendente).

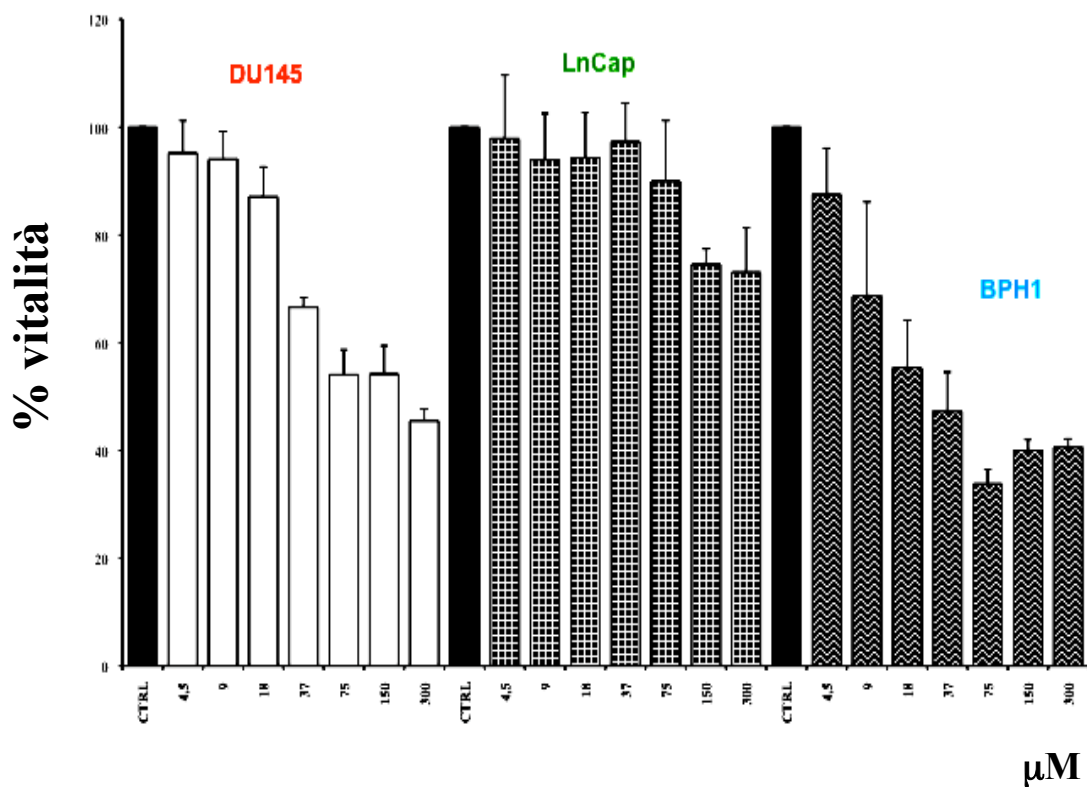


Fig. 11: Determinazione della vitalità cellulare mediante MTT test; ciascun risultato rappresenta la media \pm D.S. di 5 determinazioni sperimentali.
* $p < 0,005$ rispetto al controllo

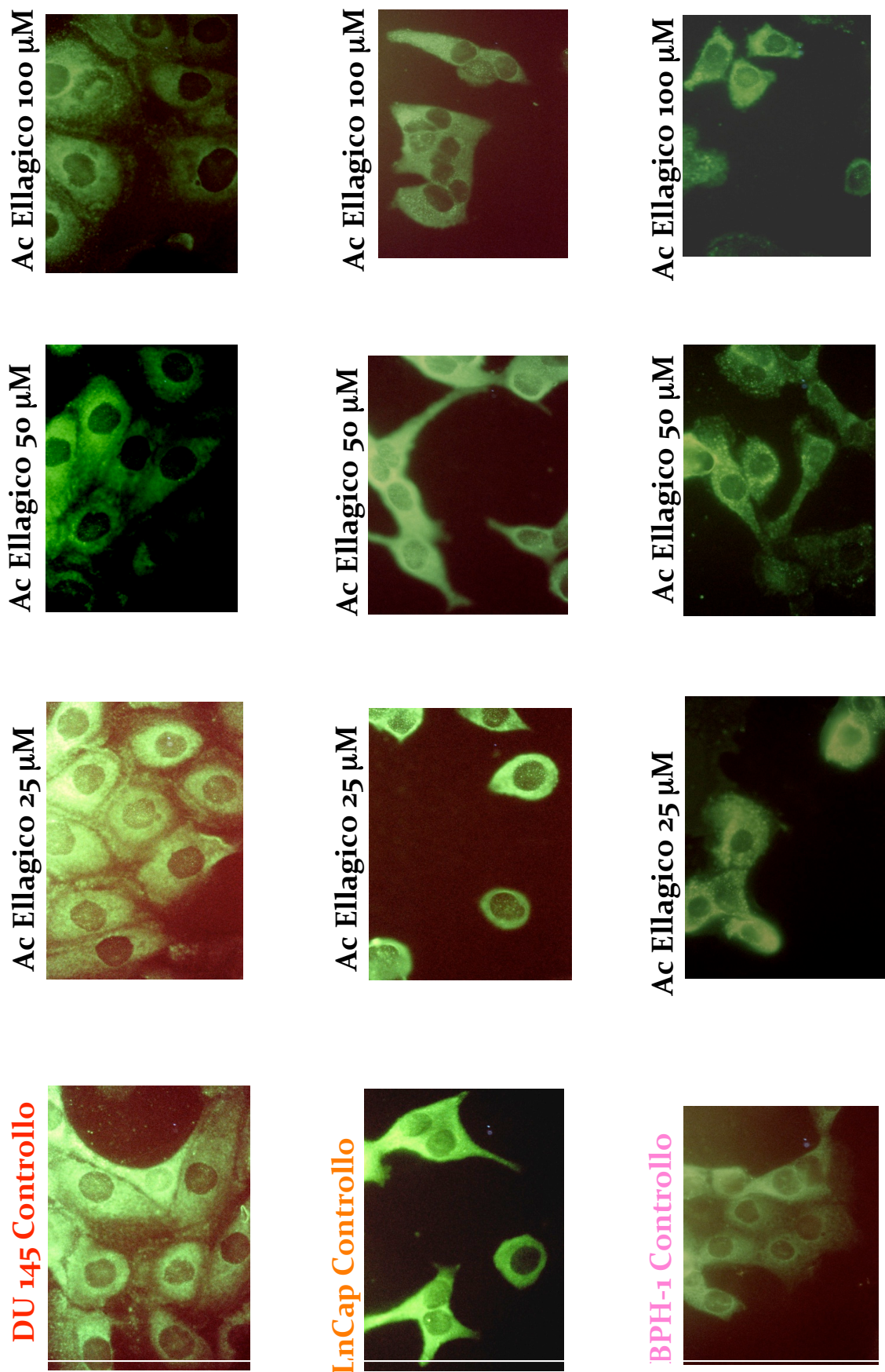


Fig. 12: Espressione della cromogranina A ed effetto dell'acido ellagico a diverse concentrazioni (25-50-100 μM) nelle DU145, LnCap e BPH1; ciascun risultato rappresenta la media \pm D.S. di 5 determinazioni sperimentali.

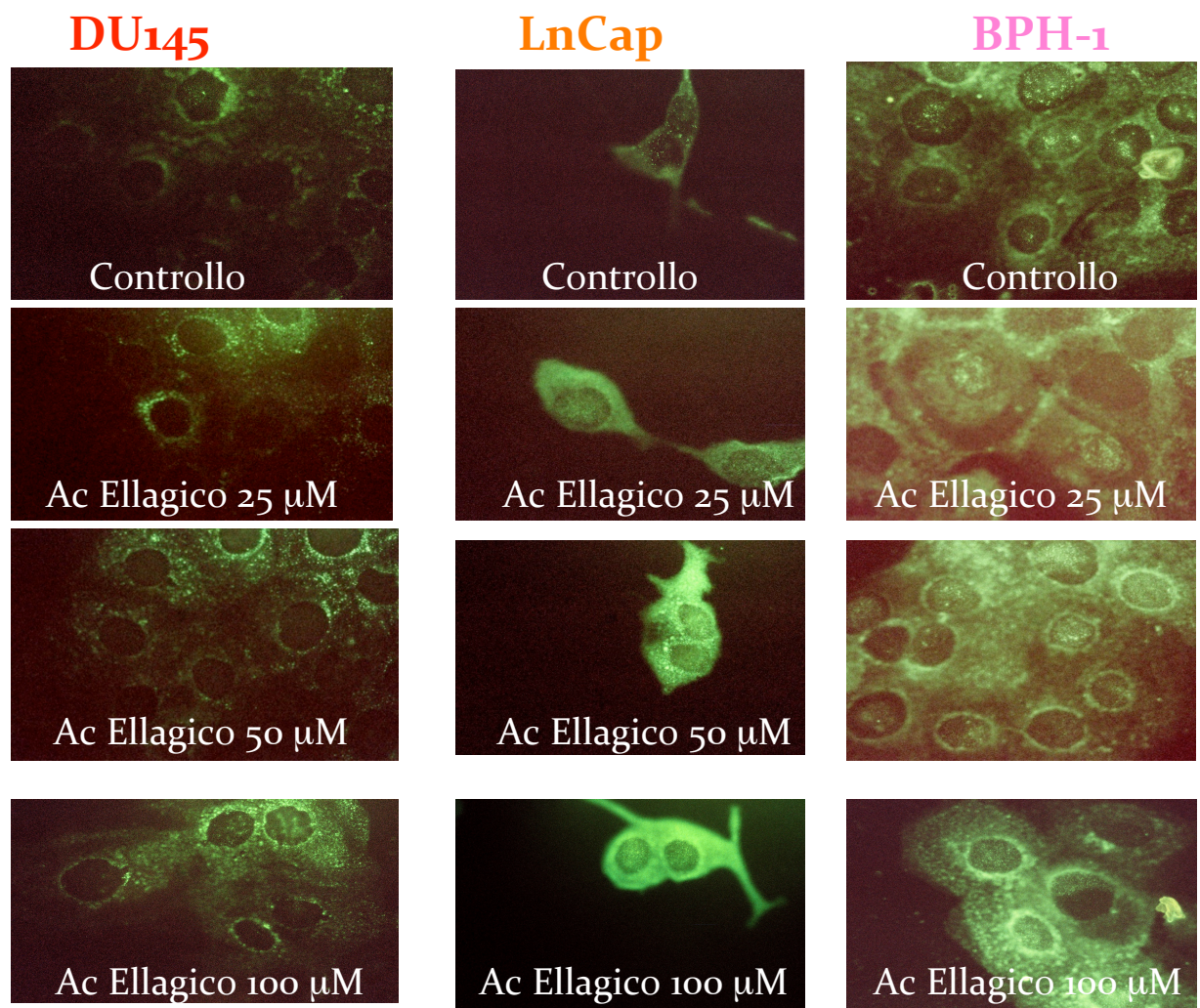


Fig. 13: Espressione della glicoproteina p75NGFR ed effetto dell'acido ellagico a diverse concentrazioni (25-50-100 μ M) nelle DU145, LnCap e BPH1; ciascun risultato rappresenta la media \pm D.S. di 5 determinazioni sperimentali.

DNMT-1 expression

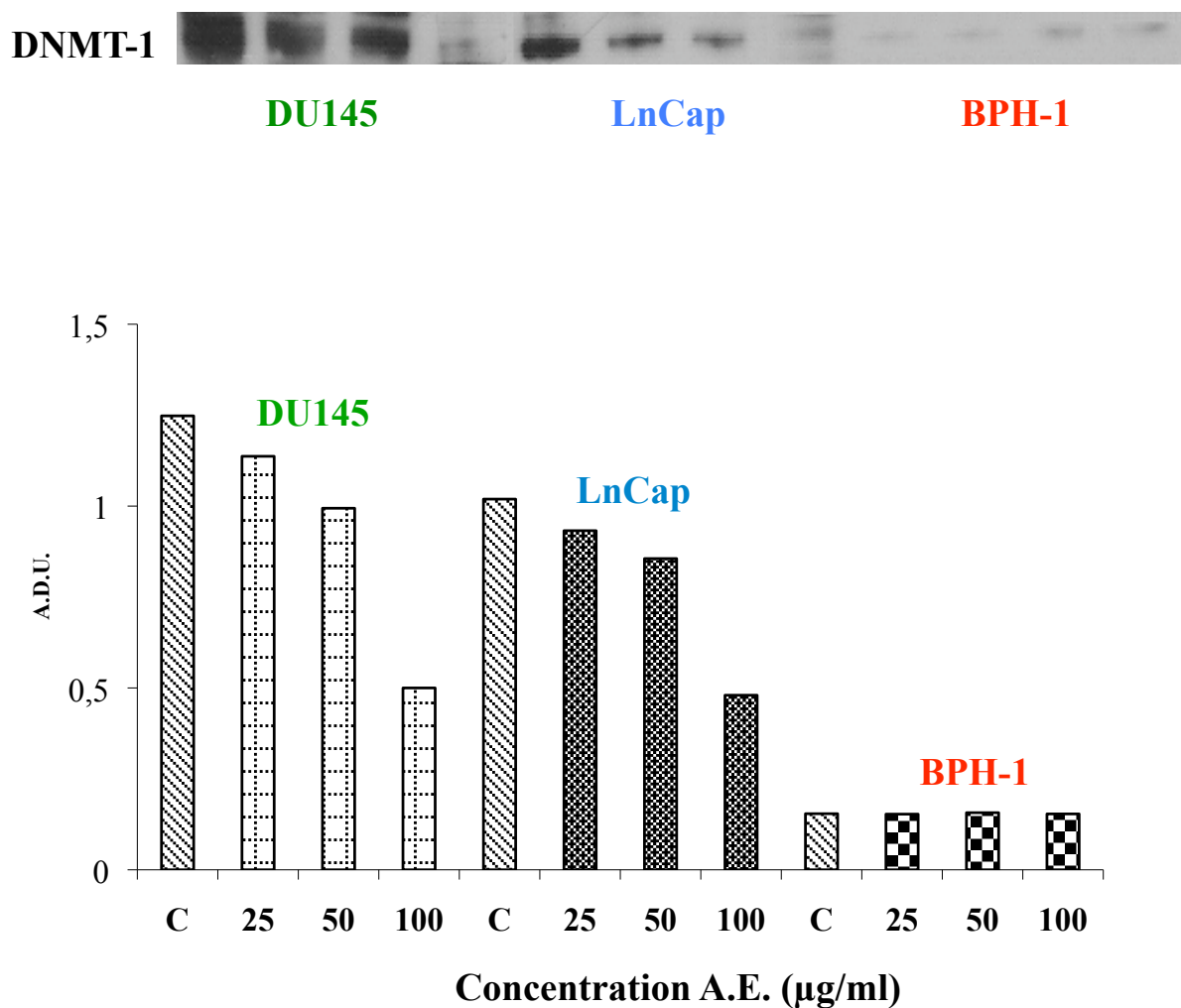


Fig. 14: Espressione della proteina DNMT-1 ed effetto dell'acido ellagico a diverse concentrazioni (25-50-100 µM) nelle DU145, LnCap e BPH1; ciascun risultato rappresenta la media \pm D.S. di 5 determinazioni sperimentali.

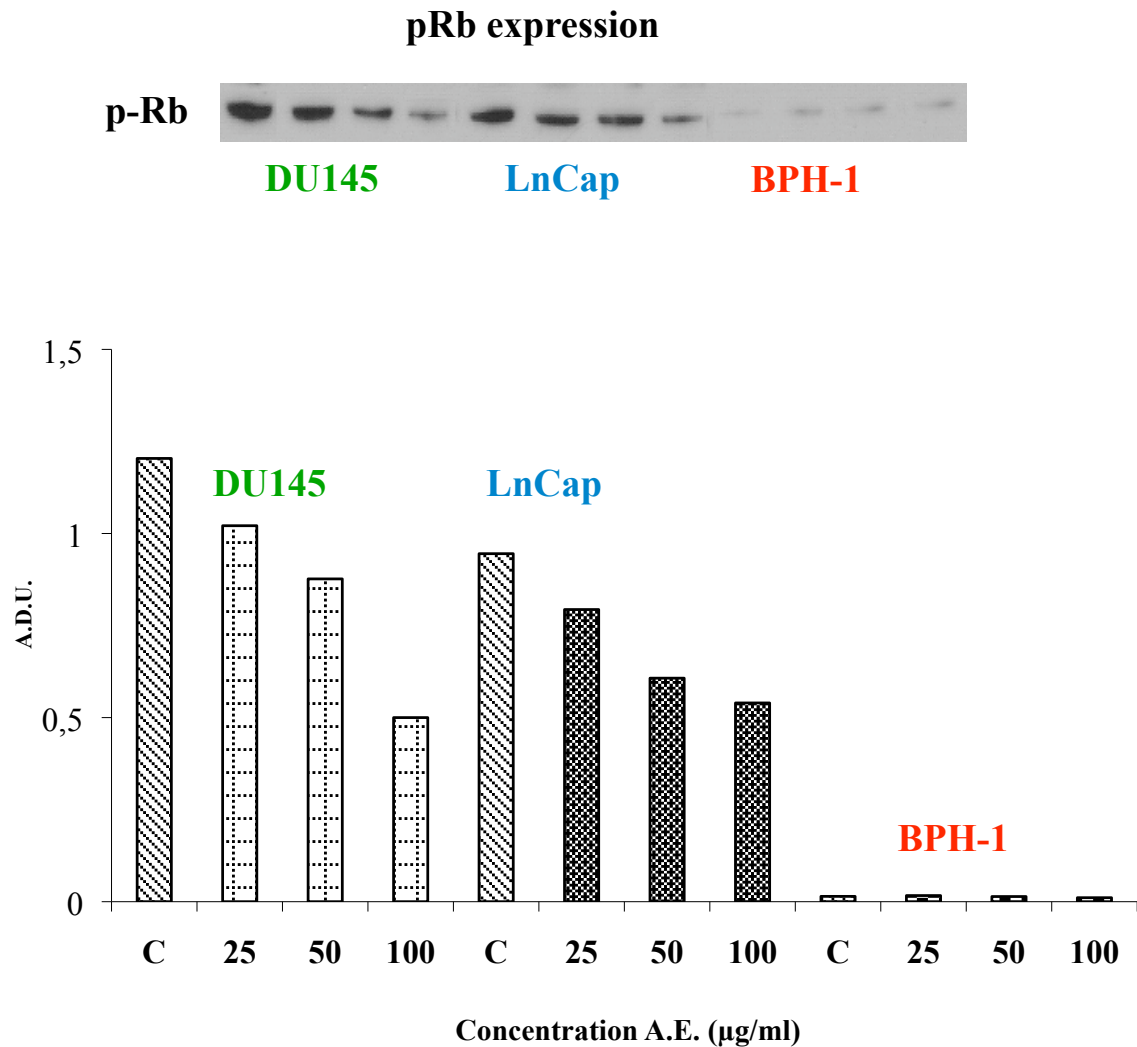


Fig. 15: Espressione della proteina pRb ed effetto dell'acido ellagico a diverse concentrazioni (25-50-100 µM) nelle DU145, LnCap e BPH1; ciascun risultato rappresenta la media \pm D.S. di 5 determinazioni sperimentali.

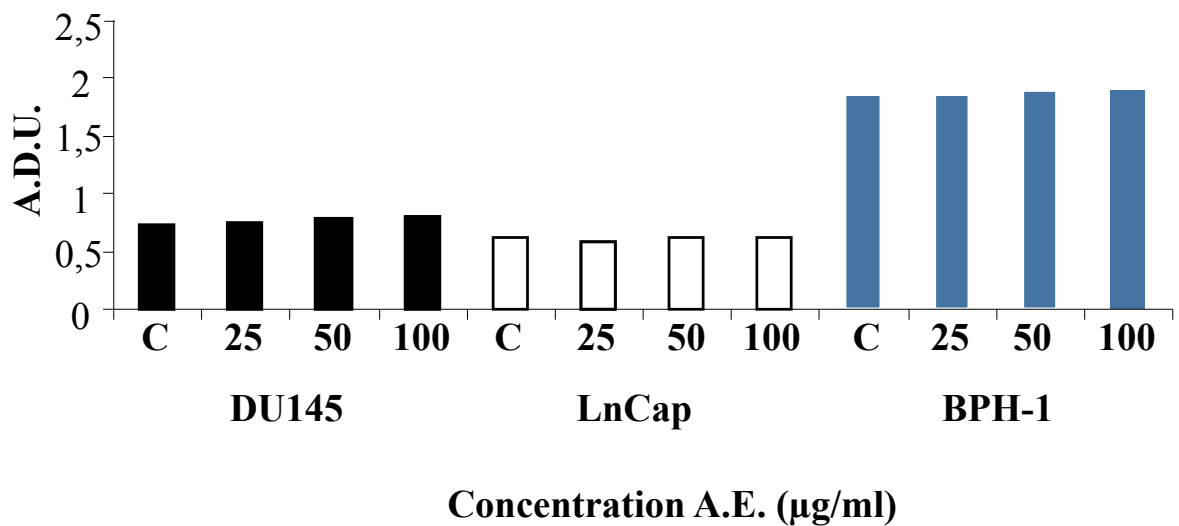
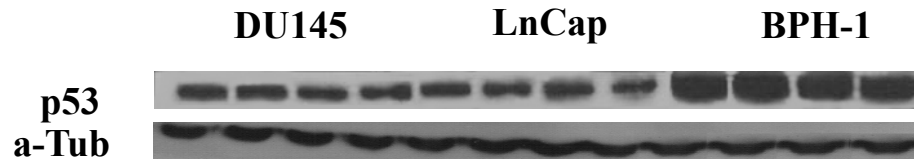


Fig. 16: Espressione della proteina p53 ed effetto dell'acido ellagico a diverse concentrazioni (25-50-100 μM) nelle DU145, LnCap e BPH1; ciascun risultato rappresenta la media \pm D.S. di 5 determinazioni sperimentali.

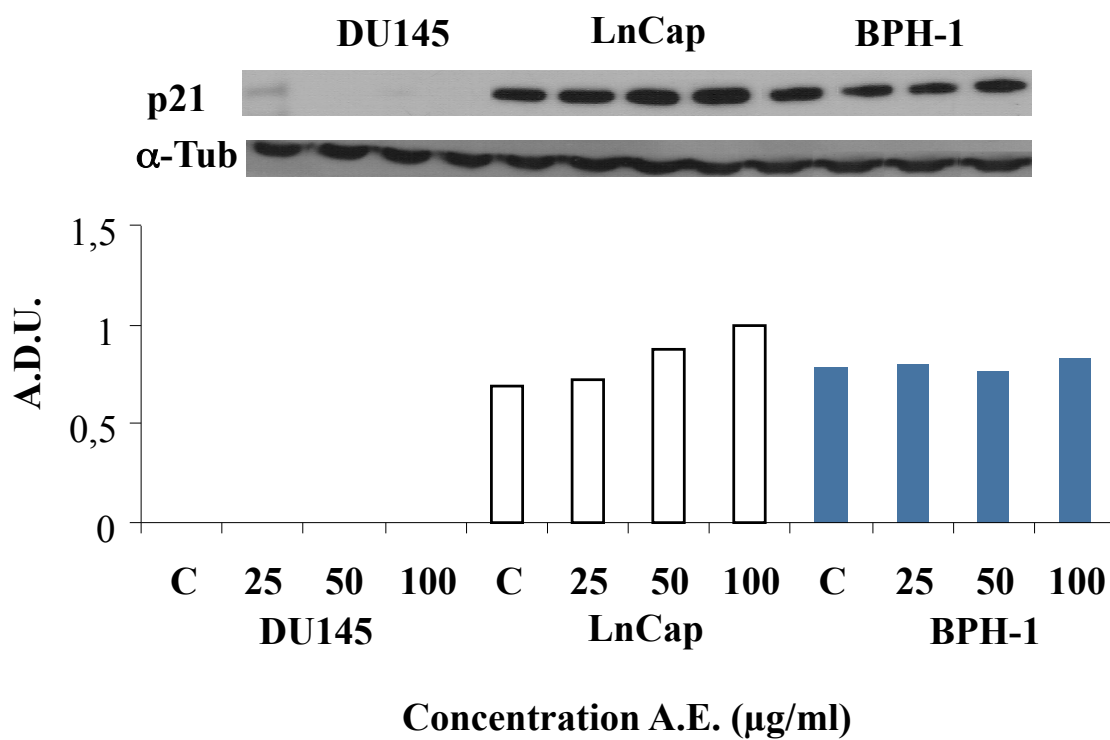


Fig. 17: Espressione della proteina p21 ed effetto dell'acido ellagico a diverse concentrazioni (25-50-100 μ M) nelle DU145, LnCap e BPH1; ciascun risultato rappresenta la media \pm D.S. di 5 determinazioni sperimentali.

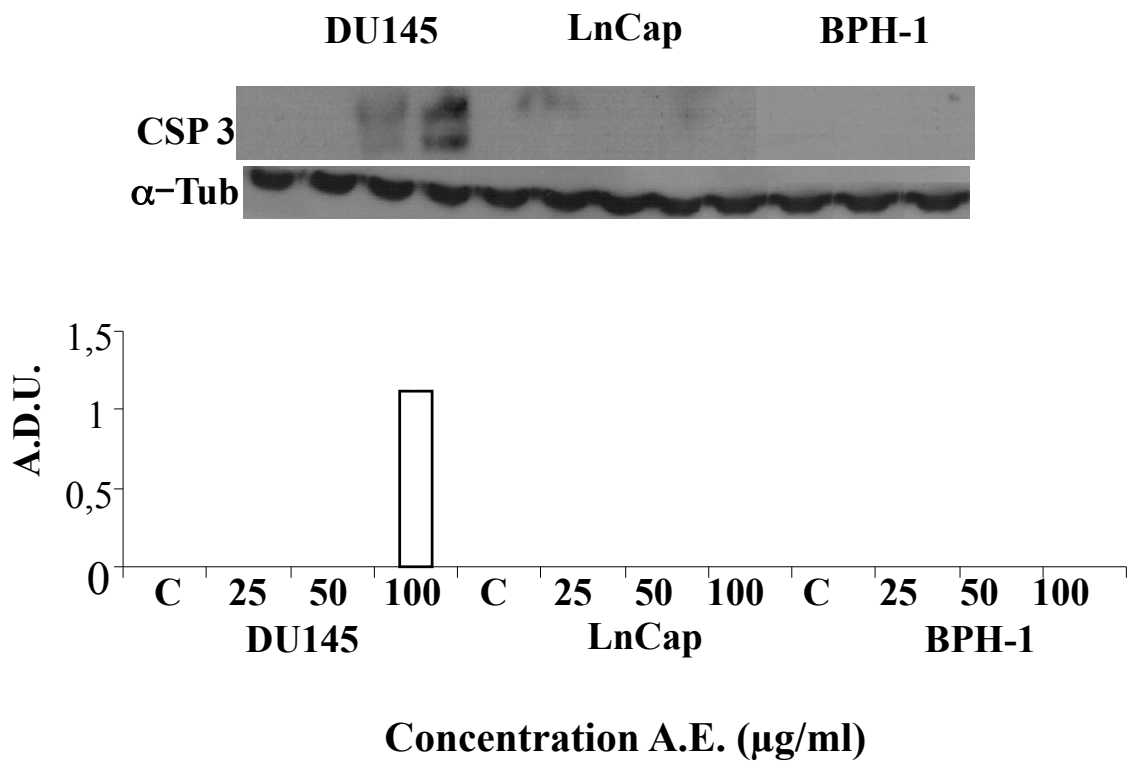


Fig. 18: Espressione della proteina caspasi 3 ed effetto dell'acido ellagico a diverse concentrazioni (25-50-100 µM) nelle DU145, LnCap e BPH1; ciascun risultato rappresenta la media \pm D.S. di 5 determinazioni sperimentali.

LDH release

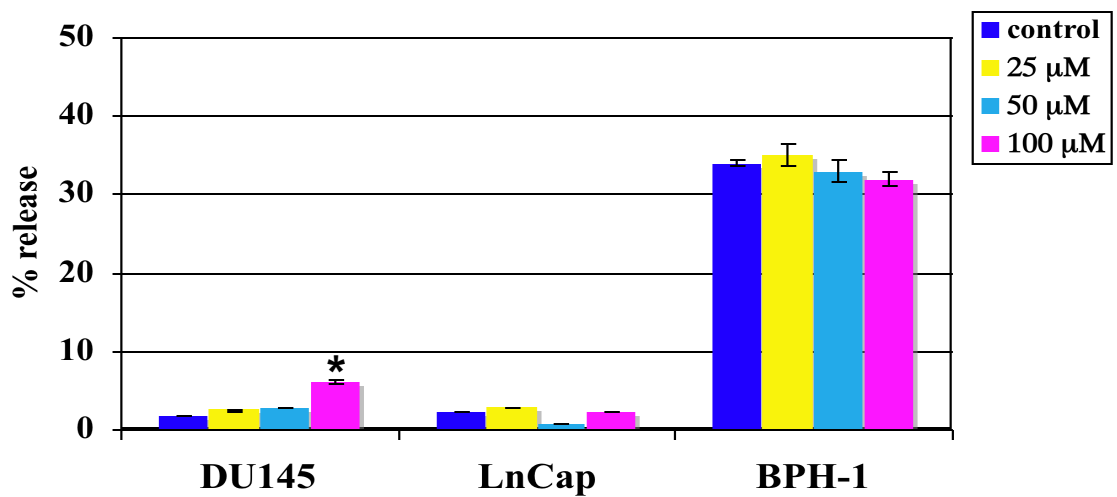


Fig. 19: determinazione del rilascio di LDH ed effetto dell'acido ellagico a diverse concentrazioni (25-50-100 μM) nelle DU145, LnCap e BPH1; ciascun risultato rappresenta la media \pm D.S. di 5 determinazioni sperimentali. * $p < 0,005$ rispetto al controllo.

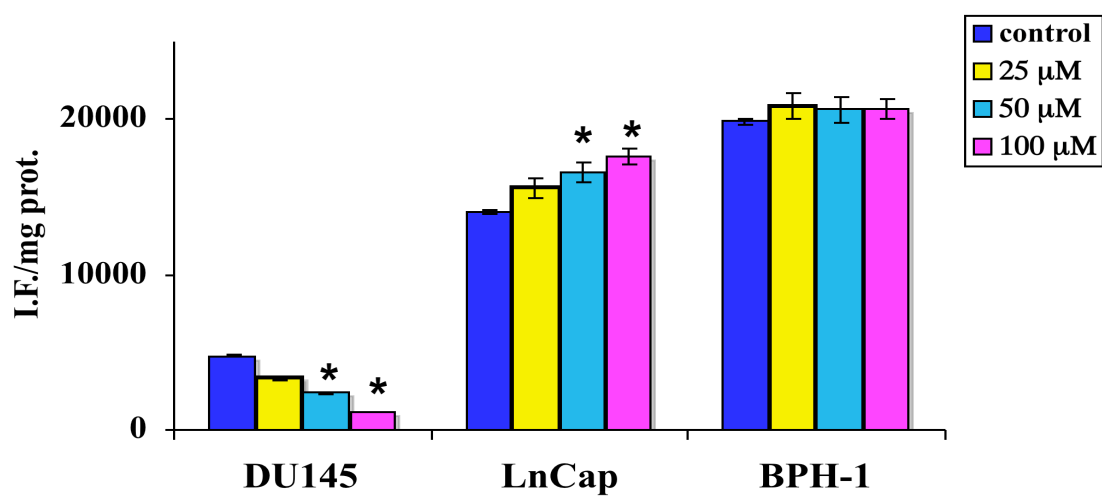


Fig. 20: Determinazione dei ROS intracellulari ROS ed effetto dell'acido ellagico a diverse concentrazioni (25-50-100 μM) nelle DU145, LnCap e BPH1; ciascun risultato rappresenta la media \pm D.S. di 5 determinazioni sperimentali. * $p < 0,005$ rispetto al controllo

Bibliografia

Acquaviva R., Campisi A., Murabito P., Raciti G., Avola R., Mangiameli S., Musumeci I., Barcellona M.L., Vanella A., Li Volti G. Propofol attenuates peroxynitrite mediated DNA damage and apoptosis in cultured astrocytes: an alternative protective mechanism *Anaesthesiology* 2004; 101, 1363-1371.

Beyer R.E. An analysis of the role of coenzyme Q in free radical generation and as an antioxidant. *Biochem Cell Biol.* 1992;70:390-403.

Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-254.

Chen J., Xu X. Diet, epigenetic, and cancer prevention. *Adv. Genet.* 2010; 71:237-55.

Dai Z., Nair V., Khan M., Ciolino H.P. Pomegranate extract inhibits the proliferation and viability of MMTV-Wnt-1 mouse mammary cancer stem cells in vitro. *Oncol. Rep.* 2010; 24:1087-91

Di Croce L., Raker V.A., Corsaro M., Fazi F., Fanelli M., Faretta M., Fuks F., Lo Coco F., Kouzarides T., Nervi C., Minucci S., Pelicci P.G. Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. *Science.* 2002; 295:1079-82.

Díaz-Laviada I. Effect of capsaicin on prostate cancer cells. *Future Oncol.* 2010;6:1545-50

Forsburg, S. L. and P Nurse. Cell cycle regulation in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Annu Rea Cell Biol.* 1991; 7:227-256.

Gao F.H., Hu X.H., Li W., Liu H., Zhang Y.J., Guo Z.Y., Xu M.H., Wang S.T., Jiang B., Liu F., Zhao Y.Z., Fang Y., Chen F.Y., Wu Y.L. Oridonin induces apoptosis and senescence in colorectal cancer cells

by increasing histone hyperacetylation and regulation of p16, p21, p27 and c-myc. *BMC Cancer*. 2010;10:610.

Guan Y.F., Zhang Y.H., Breyer R.M., Davis L., Breyer M.D. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human transitional bladder and its role in inducing cell death. *Neoplasia* 1999; 1:330–339.

Hagiwara Y., Kasukabe T., Kaneko Y., Niitsu N., Okabe-Kado J. Ellagic acid, a natural polyphenolic compound, induces apoptosis and potentiates retinoic acid-induced differentiation of human leukemia HL-60 cells. *Int J. Hematol.* 2010;92 :136-43.

Hsieh T.C., Huang Y.C., Wu J.M. Control of prostate cell growth, DNA damage and repair, and gene expression by resveratrol analogues, in vitro. *Carcinogenesis*. 2010

Huang J., Wu C., Sant'Agnese P.A., Yao J.L., Cheng L., Na Y. Function and molecular mechanisms of neuroendocrine cells in prostate cancer. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 2007 29:128-38.

James M.A., Fu H., Liu Y., Chen D.R., You M. Dietary administration of berberine or Phellodendron amurense extract inhibits cell cycle progression and lung tumorigenesis. *Mol. Carcinog.* 2010 Nov 8

Kastan, M.B. and J. Bartek. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*. 2004; 432: 316-323.

Kumar R., Verma V., Jain A., Jain R.K., Maikhuri J.P., Gupta G. Synergistic chemoprotective mechanisms of dietary phytoestrogens in a select combination against prostate cancer. *J. Nutr. Biochem.* 2010 Nov 8.

Lim H.W., Hong S., Jin W., Lim S., Kim S.J., Kang H.J., Park E.H., Ahn K., Lim C.J. Up-regulation of defense enzymes is responsible for low reactive oxygen species in malignant prostate cancer cells. *Exp Mol Med.* 2005; 37:497-506.

Maher D.M., Bell M.C., O'Donnell E.A., Gupta B.K., Jaggi M., Chauhan S.C. Curcumin suppresses human papillomavirus oncoproteins, restores p53, Rb, and PTPN13 proteins and inhibits benzo[a]pyrene-induced upregulation of HPV E7. *Mol. Carcinog.* 2010 Nov 8.

Malumbres, M. and Barbacid M. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci.* 2005; 30: 630-641.

Mueller E., Sarraf P., Tontonoz P, Evans R.M., Martin K.J. Zhang M., Fletcher C., Singer S., Spiegelman B.M. Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR gamma. *Mol. Cell.* 1998; 1:465–470.

Norbury, C. and Nurse P. Animal cell cycles and their control. *Ann. Rev. Biochem.* 1992; 61: 441-470.

Raha S., McEachern G.E., Myint A.T., Robinson B.H. Superoxides from mitochondrial complex III: the role of manganese superoxide dismutase. *Free Radic. Biol. Med.* 2000; 29, 170-80.

Russell, P. Checkpoints on the road to mitosis. *Trends Biochem Sci.* 1998; 23: 399-402.

Russo A., La Fauci L., Acquaviva R., Campisi A., Raciti G., Scifo C., Renis M., Galvano G., Vanella A. and Galvano F. Ochratoxin A-induced DNA damage in human fibroblast: protective effect of cyanidin 3-*O*- β -D-glucoside. *J. Nutr. Biochem.* 2005; 16: 31-37.

Salo D.C., Pacifici R.E., Lin S.W., Giulivi C., Davies K.J. Superoxide dismutase undergoes proteolysis and fragmentation following oxidative modification and inactivation. *J. Biol. Chem.* 1990;265:11919-27.

Sant'Agnese P.A. Neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma: an update on recent developments. *Ann. Oncol.* 2001; 2:S135-40.

Santoro R., Blandino G. p53: The pivot between cell cycle arrest and senescence. *Cell Cycle*. 2010;9(21).

Spiteller G. Peroxyl radicals: inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products. *Free Radic. Biol. Med.* 2006;1:362-87.

Tontonoz P., Singer S., Forman B.M., Sarraf P., Fletcher J.A., Fletcher C.D.M., Brun R.P., Mueller E., Altiock S., Oppenheim H., Evans R.M, Spiegelman B.M. Terminal differentiation of human liposarcoma cells induced by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the retinoid X receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94:237–241.

Tronstad K.J., Bruserud O., Berge K., Berge R.K. Antiproliferative effects of a non- beta-oxidizable fatty acid, tetradecylthioacetic acid, in native human acute myelogenous leukemia blast cultures. *Leukemia* 2002;16:2292–2301.

Veeraraghavan J., Natarajan M., Herman T.S., Aravindan N. Curcumin-altered p53-response genes regulate radiosensitivity in p53-mutant Ewing's sarcoma cells. *Anticancer Res.* 2010, 30:4007-15.

Vousden, K. H. Activation of the p53 tumor suppressor protein. *Biochim Biophys Acta.* 2002; 1602:47-59.

Wagner D.G., Yao J.L., Sant'Agnese P.A., Cheng L., Lopez-Beltran A., Montironi R., Huang J. Soft tissue tumors of the prostate: a review. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 2007; 29:341-50.

Wu C.Y., Na Y.Q., Yao J.L, Sant'Agnese P.A., Huang JT. Neuroendocrine differentiation in prostate cancer. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.* 2006;35:565-7.

Yu D.S., Hsieh D.S., Chang S.Y. Modulation of prostate carcinoma cell growth and apoptosis by chromogranin A. *J. Urol.* 2003;170:2031-5.