



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DOTTORATO DI RICERCA IN FARMACOLOGIA E TOSSICOLOGIA
XXII Ciclo

Settore scientifico disciplinare di afferenza: BIO/14

**MANIPOLAZIONE DEL METABOLISMO DEGLI
XENOBIOTICI DA FRUTTA CONVENZIONALE ED
ATTIVITA' CHEMIOPREVENTIVA**

Tesi di Dottorato di:

Dott. ssa BARBARA BONAMASSA

Coordinatore:
Chiar. Mo Prof.
GIORGIO CANTELLI FORTI

Tutor:
Chiar. Mo Prof.
MORENO PAOLINI

INDICE

INTRODUZIONE E SCOPO DELLA RICERCA	1
CAPITOLO 1: CANCEROGENESI CHIMICA E CHEMIOPREVENZIONE	7
1.1 Le fasi della cancerogenesi chimica	7
1.2 Il ruolo del metabolismo nella cancerogenesi chimica	10
1.3 I livelli di chemioprevenzione	11
1.4 Classificazione degli agenti chemiopreventivi	13
1.4.1 <i>Gli inibitori della formazione del cancro</i>	14
1.4.2 <i>Gli agenti bloccanti</i>	15
1.4.3 <i>Gli agenti soppressori</i>	19
CAPITOLO 2: GLI ENZIMI DEL <i>DRUG-METABOLISM</i>	26
2.1 Introduzione	26
2.2 Caratteristiche degli enzimi di fase I, II e III	27
2.3 Enzimi e sistemi di fase I	30
2.4 Il sistema monoossigenasico citocromo P450- dipendente	32
2.4.1 <i>L'evoluzione dei CYP</i>	33
2.4.2 <i>La nomenclatura dei CYP</i>	35
2.4.3 <i>La struttura dei CYP e della NADPH-citocromo P450-reduttasi</i>	38
2.4.4 <i>Biochimica e meccanismo d'azione del sistema monoossigenasico</i>	45
2.4.5 <i>Le isoforme umane di CYP</i>	50
2.5 Le flavin-monoossigenasi o FMO	61
2.6 Enzimi di fase II	63
2.7 Enzimi e sistemi di fase III	71

CAPITOLO 3: NATURA E VARIABILITA' DEGLI ENZIMI DEL <i>DRUG-METABOLISM</i>	76
3.1 La doppia natura degli enzimi	76
3.2 La variabilità	78
3.2.1 <i>La modulazione delle isoforme CYP</i>	79
3.2.2 <i>La modulazione degli enzimi di fase II</i>	92
3.2.3 <i>La modulazione degli enzimi di fase III</i>	94
3.2.4 <i>I polimorfismi genetici</i>	95
3.3 Conclusioni	100
CAPITOLO 4: CANCEROGENESI E STRESS OSSIDATIVO	103
4.1 Introduzione	103
4.2 Fonti di ROS	103
4.3 Chimica dei ROS	108
4.4 I sistemi di difesa antiossidante	111
4.4.1 <i>Enzimi antiossidanti</i>	113
4.4.2 <i>Antiossidanti non enzimatici</i>	117
4.5 Danno ossidativo e cancerogenesi	124
4.5.1 <i>Il danno genotossico</i>	125
4.5.2 <i>Il danno epigenetico</i>	127
4.6 Le specie reattive dell'azoto (RNS)	132
CAPITOLO 5: I VEGETALI E IL CANCRO	135
5.1 Attività chemiopreventiva della cipolla (<i>Allium cepa</i>)	135
5.1.1 <i>La cipolla ed i composti fitochimici</i>	135
5.1.2 <i>I meccanismi molecolari dell'attività chemiopreventiva dei vegetali del genere Allium e dei loro costituenti</i>	141

5.1.3	<i>Gli studi epidemiologici e le meta-analisi</i>	146
5.1.4	<i>I trials clinici</i>	150
5.2	Attività chemiopreventiva della pomodoro (<i>Solanum lycopersicum</i> o <i>Lycopersicum esculentum</i>)	151
5.2.1	<i>Il pomodoro ed i composti fitochimici</i>	152
5.2.2	<i>I meccanismi molecolari dell'attività chemiopreventiva del pomodoro e dei suoi costituenti</i>	160
5.2.3	<i>Gli studi epidemiologici e le meta-analisi</i>	165
5.2.4	<i>I trials clinici</i>	167
5.3	Attività chemiopreventiva dell'uva (<i>Vitis Vinifera</i>)	168
5.3.1	<i>L'uva ed i composti fitochimici</i>	171
5.3.2	<i>I meccanismi molecolari dell'attività chemiopreventiva dell'uva e dei suoi costituenti</i>	177
5.3.3	<i>Gli studi epidemiologici e le meta-analisi</i>	186
5.3.4	<i>I trials clinici</i>	187
5.4	Attività chemiopreventiva della pesca (<i>Prunus Persica</i>)	188
5.4.1	<i>La pesca ed i composti fitochimici</i>	189
5.4.2	<i>I meccanismi molecolari dell'attività chemiopreventiva della pesca e dei suoi costituenti</i>	191
5.4.3	<i>Gli studi epidemiologici</i>	197
5.4.4	<i>I trials clinici</i>	198
5.5	Attività chemiopreventiva della lattuga (<i>Lactuca Sativa</i>)	202
5.5.1	<i>La lattuga ed i composti fitochimici</i>	203
5.6	Il programma alimentare <i>5 a day for a better health</i>	206
CAPITOLO 6: MATERIALI E METODI		210

6.1	Tattamento e sacrificio degli animali	210
6.2	Studio delle attività enzimatiche	212
6.2.1	<i>Determinazione dell'attività degli enzimi del drug-metabolism</i>	212
6.2.1.1	<i>Preparazione della frazione microsomiale e citosolica</i>	212
6.2.1.2	<i>Concentrazione delle proteine (metodo di Lowry)</i>	213
6.2.1.3	<i>Citocromo P450</i>	214
6.2.1.4	<i>NADPH-citocromo (P450)-c-reduttasi</i>	215
6.2.1.5	<i>Amminopirina N-demetilasi (APND)</i>	216
6.2.1.6	<i>p-Nitrofenolo idrossilasi (pNFI)</i>	216
6.2.1.7	<i>Pentossiresorufina O-dealchilasi (PROD), metossiresorufina O-demetilasi (MROD) ed etossiresorufina O-deetilasi (EROD)</i>	217
6.2.1.8	<i>7-Etossicumarina O-deetilasi (ECOD)</i>	218
6.2.1.9	<i>Testosterone idrossilasi (TOH)</i>	219
6.2.1.10	<i>Glutazione S-transferasi (GST)</i>	220
6.2.1.11	<i>UDP-glucuroniltransferasi (UDPGT)</i>	221
6.2.2	<i>Determinazione dell'attività degli enzimi antiossidanti</i>	221
6.2.2.1	<i>Catalasi (CAT)</i>	221
6.2.2.2	<i>Superossido dismutasi (SOD)</i>	222
6.2.2.3	<i>Glutazione reduttasi (GSSG-Red)</i>	222
6.2.2.4	<i>Glutazione perossidasi (GSH-Px)</i>	222
6.2.2.5	<i>DT-diaforasi</i>	222
6.3	Studio dell'espressione genica	223
6.3.1	<i>Elettroforesi su gel di poliacrilammide e Western blotting</i>	223
6.3.2	<i>Reverse transcriptase-polymerase chain</i>	224

<i>reaction (RT-PCR)</i>	
6.3.2.1 Estrazione dell'RNA totale	224
6.3.2.2 Retrotrascrizione dell'RNA totale	226
6.3.2.3 Amplificazione genica mediante PCR	226
6.4 Determinazione plasmatica della presenza di ROS mediante il test dROMs	228
6.5 Analisi ematochimiche	229
6.6 Espressione dei risultati ed analisi statistica	230
CAPITOLO 7: RISULTATI	231
7.1 Introduzione	231
7.2 Effetti delle supplementazioni a base di frutta e verdura sugli enzimi del <i>drug-metabolism</i>	234
7.2.1 Effetti delle supplementazioni mono-colore corrispondenti ad una porzione di frutta o verdura e di quella equivalente al 5 a day sugli enzimi di fase I	234
7.2.2 Effetti delle supplementazioni mono-colore corrispondenti a cinque porzioni di frutta o verdura sugli enzimi di fase I	235
7.2.3 Effetti della supplementazione mono-colore corrispondente ad una porzione di lattuga e di quella equivalente al 5 a day sulla testosterone idrossilasi	236
7.2.4 Effetti delle supplementazioni mono-colore corrispondenti ad una porzione di frutta o verdura e di quella equivalente al 5 a day sugli enzimi di fase II	237
7.2.5 Effetti delle supplementazioni mono-colore corrispondenti a cinque porzioni di frutta o verdura sugli enzimi di fase II	237

7.3 Effetti delle supplementazioni a base di frutta e verdura su enzimi antiossidanti	238
7.3.1 <i>Effetti delle supplementazioni mono-colore corrispondenti ad una porzione di frutta o verdura e di quella equivalente al 5 a day su enzimi antiossidanti</i>	238
7.3.2 <i>Effetti delle supplementazioni mono-colore corrispondenti a cinque porzioni di frutta o verdura su enzimi antiossidanti</i>	239
7.4 <i>Western blot</i> : effetti delle supplementazioni mono- colore corrispondenti ad una porzione di frutta o verdura e di quella equivalente al 5 a day sui livelli proteici degli enzimi del <i>drug-metabolism</i> di fase I	240
7.5 RT-PCR: effetti della supplementazione mono- colore corrispondente ad una porzione di lattuga e di quella equivalente al 5 a day sui livelli di mRNA degli enzimi del <i>drug-metabolism</i> di fase I ed antiossidanti	241
7.6 dROMs test: effetti delle supplementazioni a base di frutta e verdura sui livelli sistemici di ROS	242
7.6.1 <i>Effetti delle supplementazioni mono-colore corrispondenti ad una porzione di frutta o verdura e di quella equivalente al 5 a day sui livelli sistemici di ROS</i>	242
7.6.2 <i>Effetti delle supplementazioni mono-colore corrispondenti a cinque porzioni di frutta o verdura sui livelli sistemici di ROS</i>	242
7.7 Effetti delle supplementazioni a base di frutta e verdura sui principali parametri ematochimici	243
7.7.1 <i>Effetti delle supplementazioni mono-colore corrispondenti ad una porzione di frutta o verdura e di quella equivalente al 5 a day sui principali paramentri ematochimici</i>	243

<i>7.7.2 Effetti delle supplementazioni mono-colore corrispondenti a cinque porzioni di frutta o verdura sui principali parametri ematochimici</i>	244
CAPITOLO 8: DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	267
BIBLIOGRAFIA	284

INTRODUZIONE E SCOPO DELLA RICERCA

Nel 2010 il cancro è destinato a diventare la principale causa di morte in tutto il mondo, superando quindi le malattie cardiovascolari che ora rivestono il primo posto. E' quanto emerge dal nuovo *World Cancer Report* (2008) stilato dall'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) dal quale risulta che, nonostante in alcuni Paesi come gli USA l'incidenza dei tumori ed il tasso di mortalità si siano ridotti, la patologia continua a diffondersi. Dal rapporto emerge che i casi di cancro riscontrati a livello mondiale sono raddoppiati tra il 1975 ed il 2000, che raddoppieranno nuovamente entro il 2020 e che potrebbero addirittura triplicare entro il 2030. Secondo la relazione, inoltre, nel 2008 si sono verificati circa 12 milioni di nuovi casi in tutto il mondo e più di 7 milioni di persone sono morte a causa di questa patologia. Con un tasso di crescita dell'1% annuo - soprattutto nei paesi meno sviluppati che tendono ad adottare abitudini occidentali nocive - si stima che il cancro porterà nel 2030 a 20-26 milioni di nuovi casi e 13-17 milioni di morti. Inoltre, nonostante i continui progressi compiuti nel campo della diagnostica, nella comprensione dei meccanismi cellulari e molecolari della patologia neoplastica e conseguentemente nella chemioterapia, Jemal e altri (2008) hanno recentemente stimato che la probabilità di diagnosi di un tumore invasivo nel corso della vita è più del 40%.

Alla luce di questi dati allarmanti, la prevenzione riveste quindi un ruolo fondamentale. Iniziata con Berenblum (1929) e, dopo un periodo di stallo, riproposta nel settore della ricerca sul cancro con Sporn e altri (1976), la chemioprevenzione infatti gode attualmente di particolare attenzione. Le due principali modalità di difesa dal cancro consistono nell'evitare riconosciuti fattori (biologici, chimici o fisici) di rischio e nell'assunzione abituale di elevate quantità di cibi in grado di proteggere dal cancro (Glade, 1999). Se infatti, da un lato, la dieta -

fonte di agenti cancerogeni spesso associati al tipo di cottura od a molecole introdotte dall'uomo nella filiera di produzione - sembra essere responsabile di circa un terzo delle forme tumorali nel mondo occidentale (Ames e altri, 1995), dall'altro, il 30-40% dell'incidenza del cancro potrebbe essere prevenibile grazie ad una dieta salutare (insieme allo svolgimento abituale di una moderata attività fisica ed al mantenimento del peso corporeo ottimale) e più del 20% dall'elevato consumo di frutta e verdura (Glade, 1999). In particolare, l'importanza a scopo chemiopreventivo di agrumi, frutti ricchi di β -carotene (come quelli di colore verde e giallo) e vegetali (tra i quali quelli appartenenti alla famiglia delle Brassicaceae) è stata evidenziata già a partire dal 1982 (National Academy of Sciences, 1982). Da allora, la relazione tra cancro e vegetali ha goduto di una incessante attenzione da parte della ricerca e risultati incoraggianti sono stati messi in luce ininterrottamente. Nel corso degli anni, infatti, numerosi studi epidemiologici hanno messo in risalto l'esistenza di un'associazione inversa tra il consumo di una dieta ricca di frutta e verdura ed il rischio di cancro (Block e altri, 1992; Reddy e altri, 2003; Benetou e altri, 2008; Freedman e altri, 2008). In particolare, fra questi, quello condotto da Block e altri (1992) suscitò particolare attenzione ed interesse: rilevava, infatti, un effetto chemiopreventivo significativo di frutta e verdura in 128 su 156 studi esaminati ed un rischio di cancro doppio per i consumatori di modeste quantità di frutta e verdura rispetto a quelli abituati ad assumerne elevate quantità.

I costituenti alimentari di origine vegetale ai quali sarebbe ascritta l'attività salutistica di frutta e verdura sono macronutrienti come fibre, grassi, carboidrati e proteine e micronutrienti come vitamine e minerali. Negli ultimi anni però molta attenzione è stata dedicata soprattutto ai composti fitochimici (*phytochemicals*) (Müller e altri, 2003), non-nutrienti della matrice vegetale molti dei quali sono dotati di sostanziali effetti antimutageni e anticancerogeni (Surh, 2003) che si pensa possano contribuire al controllo del processo di

cancerogenesi. Le sostanze fitochimiche comprendono decine di migliaia di composti appartenenti a svariate classi chimiche e famiglie botaniche anche estremamente differenti. Costituiscono quindi un insieme estremamente disomogeneo di molecole dotate di un'attività biologica molto marcata che si esplica attraverso una grande varietà di meccanismi (Carratù e Sanzini, 2005).

Fra questi è stata individuata la capacità nutrigenomica, cioè la facoltà degli ortaggi e/o dei loro costituenti di agire come segnali captati da sensori cellulari in grado di interagire con il genoma e conseguentemente di modulare l'espressione genica e/o il contenuto proteico e metabolico della cellula (Müller e altri, 2003).

Nell'ambito di quest'ultimo meccanismo, in virtù del ruolo del metabolismo nel processo di cancerogenesi, ha richiamato particolare attenzione la capacità dei suddetti *phytochemicals* di influenzare il contenuto cellulare e/o l'attività degli enzimi del *drug-metabolism* di fase I e II. La capacità di questi ultimi di essere modulati (a livello trascrizionale, post-trascrizionale e post-traduzionale) per rispondere in modo adattativo agli insulti ambientali e nutrizionali è infatti il principio su cui si basa la teoria chemiopreventiva classica.

In base a quest'ultima, gli enzimi di fase I (in particolare il sistema monoossigenasico citocromo P450-dipendente) bioattiverrebbero i cancerogeni indiretti a cancerogeni terminali in grado di interagire con il DNA e causare quindi un danno genetico, evento alla base del processo della cancerogenesi chimica. Al contrario, gli enzimi di fase II sarebbero responsabili della detossificazione degli intermedi elettrofili generati coniugandoli con molecole endogene polari e quindi rendendo più rapida la loro escrezione. Ne consegue che lo sviluppo della neoplasia in un determinato tessuto sarebbe strettamente correlato all'equilibrio tra attivazione metabolica e reazioni di inattivazione. In tale contesto quindi l'inattivazione degli enzimi di fase I e/o l'induzione di quelli di fase II risulterebbero di particolare rilevanza a scopo chemiopreventivo. Infatti, sebbene tale teoria sia superata ormai da diversi decenni, tanto che numerosi

articoli scientifici e rassegne ne dimostrano l'incompleta fondatezza (Paolini e Legator, 1992; Paolini e Nestle, 2003), costituirebbe ancora oggi un'auspicata strategia chemiopreventiva.

Inoltre, oltre alla modulazione degli enzimi del *drug-metabolism*, considerato il coinvolgimento dello stress ossidativo in tutte le fasi della cancerogenesi chimica (Valko e altri, 2006), molta attenzione è stata dedicata alla capacità antiossidante diretta ed indiretta dei vegetali e dei loro costituenti (si veda capitolo 5). Alla base della cosiddetta "ipotesi antiossidante" vi sarebbe la capacità degli antiossidanti di interferire con e/o prevenire il danno ossidativo al DNA, lipidi e proteine agendo da *scavenger* diretti dei radicali o prevenendo la loro formazione e favorendone la decomposizione attraverso la modulazione di enzimi antiossidanti come catalasi, superossido dismutasi, perossidasi, ecc... Una considerevole assunzione di composti fitochimici antiossidanti attraverso la dieta, prevenendo o riducendo il danno ossidativo alla base di numerosissime patologie degenerative, sarebbe quindi in grado ridurre il rischio di malattie croniche (Stanner e altri, 2004) come ad esempio le quelle cardio-vascolari (Mirmiran e altri, 2009), la degenerazione maculare senile (Goldberg e altri, 1998), la cataratta (Mares-Perlman e altri, 1995; Brown e altri, 1999), malattie polmonari croniche ostruttive come l'asma e la bronchite (Miedema e altri, 1993; La Vecchia e altri, 1998) e, come anticipato precedentemente, il cancro.

Tuttavia, la scoperta di queste attività biologiche sono state percepite in modo piuttosto riduttivo: infatti, si è gradualmente fatta strada, tra le abitudini alimentari, l'adozione di regimi "mono-dietetici", che prevedono cioè il massiccio consumo di una singola varietà di frutta o verdura in relazione al suo elevato contenuto di *phytochemicals* dotati di specifici meccanismi d'azione o, addirittura, la supplementazione della dieta con singoli composti fitochimici come glucosinolati, carotenoidi, polifenoli, vitamine, ecc... o con una combinazione di pochi di essi.

Questi approcci, tuttavia, non solo non hanno messo in luce alcun effetto benefico ma, al contrario, hanno fatto emergere come il passaggio da un'alimentazione varia ad una più selezionata possa addirittura aumentare il rischio tossicologico individuale (Stanner e altri, 2004). Tali risultati hanno quindi sottolineato l'importanza di considerare *patterns* alimentari, piuttosto che singole categorie di cibi o addirittura molecole isolate (Hu, 2002), che, una volta estrapolate dalla loro matrice alimentare, possono provocare effetti tutt'altro che chemiopreventivi.

Parallelamente, quindi, inizia a diffondersi la raccomandazione di consumare vegetali nella loro interezza. La *National Academy of Sciences* (1989) individua in cinque (o più) porzioni il quantitativo ottimale di frutta e verdura da consumare ogni giorno. Tale sollecitazione viene successivamente tramutata in un vero e proprio programma di salute pubblica negli USA - *5 a day for a better health* - sponsorizzato dal *National Cancer Institute* (NCI) a partire dal 1991 e divenuto poi *5 a day, the color way*. Tale campagna di educazione alimentare raccomanda il consumo giornaliero di una porzione di frutta o verdura per ognuno dei cinque gruppi di colore in cui i vegetali vengono suddivisi (blu/viola, verde, giallo/arancio, rosso e bianco), per un totale di almeno 5 (fino a 9) porzioni di vegetali al giorno per combattere il cancro (Reynolds, 1991). Attraverso un messaggio semplice ma accattivante sia per gli adulti che per i bambini, l'NCI ha puntato quindi sul colore come strategia di promozione della varietà alimentare come mezzo di controllo dell'incidenza del cancro. Nonostante la successiva diffusione di questo programma in tutta Europa e l'entusiasmante recepimento del suo messaggio a livello commerciale anche in Italia, a tutt'oggi manca in letteratura qualunque tipo di studio sperimentale, epidemiologico o clinico che attesti la sua (tanto propagandata) efficacia chemiopreventiva.

Scopo del presente lavoro è stato quello di simulare nel modello animale (ratto maschio, ceppo *Sprague Dawley*) gli effetti di una

supplementazione della dieta in accordo al programma alimentare sponsorizzato dal NCI. E' stata studiata la capacità di tale supplementazione multi-colore giallo, rosso, verde, viola e bianco, in confronto a quelle mono-colore giallo, rosso, verde, viola o bianco, di modulare *in vivo* in termini chemiopreventivi l'attività, il contenuto o l'espressione degli enzimi epatici del *drug-metabolism* di fase I e II e di quelli antiossidanti ed i livelli plasmatici delle specie reattive dell'ossigeno.

CAPITOLO 1

CANCEROGENESI CHIMICA E CHEMIOPREVENZIONE

1.1 Le fasi della cancerogenesi chimica

La cancerogenesi chimica è un processo multifattoriale e multifasico che si verifica cioè a tappe successive sia a livello genetico che fenotipico. Tipicamente viene suddiviso in tre fasi: iniziazione, promozione e progressione (fig. 1.1).

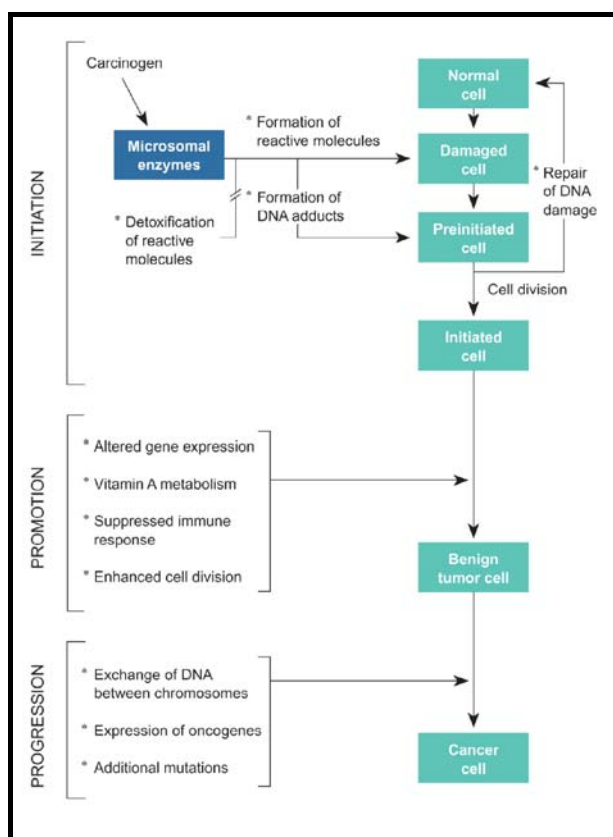


Figura 1.1. Schema generale delle fasi e degli eventi del processo di cancerogenesi chimica.

L'iniziazione deriva dall'esposizione delle cellule ad un'appropriata dose di agente cancerogeno genotossico, una sostanza chimica in grado di determinare un danno cromosomico o una mutazione genetica non letali. L'interazione tra l'agente cancerogeno e il DNA non è del tutto casuale ed ogni classe di sostanze tende a produrre un determinato tipo di danno imprimendo una sorta di "impronta digitale" molecolare. Perché si sviluppi il cancro è necessario che i bersagli di tale danno genetico siano costituiti da specifiche classi di geni che normalmente regolano importanti funzioni cellulari:

- oncogeni: derivano dall'alterazione genetica dei proto-oncogeni, geni cellulari che promuovono i normali processi di crescita. Tra questi vi sono i fattori di crescita, i recettori per i fattori di crescita, proteine coinvolte nei meccanismi di trasduzione del segnale come ras, proteine che regolano la trascrizione nucleare come myc, regolatori del ciclo cellulare come cicline e chinasi ciclina-dipendenti (CDK);
- geni oncosoppressori: regolano la crescita cellulare inibendola. Fra questi, i più frequentemente mutati in molte neoplasie umane sono p53 e pRb, due regolatori del ciclo cellulare e APC, molecola coinvolta nell'inibizione dei segnali che promuovono la crescita;
- geni che regolano l'apoptosi;
- geni che regolano la riparazione del DNA;
- telomerasi: la riattivazione della telomerasi sembra essere il meccanismo attraverso il quale le cellule neoplastiche manifestano la loro elevata capacità replicativa (Carbone e altri, 2004; Tsao e altri, 2004).

Vi è da precisare che la mutazione di un solo gene di una delle summenzionate classi da sola non è in grado di trasformare completamente una cellula. Ogni tumore umano infatti mostra alterazioni genetiche multiple che consistono nell'attivazione di diversi oncogeni e nella perdita di due o più geni oncosoppressori: questa cooperazione è necessaria in quanto ciascun gene alterato è

specializzato nell'induzione di una parte del fenotipo canceroso. In più si ritiene che anche la sequenza temporale con cui insorgono le mutazioni sia un elemento importante nel determinare lo sviluppo di una neoplasia (Shureiqi e altri, 2000).

Le alterazioni non riparate del DNA rappresentano un primo evento essenziale per il processo di cancerogenesi. Tuttavia, affinché l'alterazione diventi ereditabile, occorre che il segmento di DNA che contiene il danno venga replicato. Pertanto, perchè l'iniziazione avvenga, le cellule alterate dal cancerogeno devono subire almeno un ciclo replicativo, in modo che la modificazione del DNA si possa fissare e divenire permanente.

La promozione è la fase del processo di cancerogenesi in cui si verifica l'espansione clonale della cellula iniziata con formazione di un clone preneoplastico benigno. I cancerogeni chimici in grado di generare tale effetto non agiscono direttamente sul DNA e sono quindi definiti non-genotossici. Si tratta piuttosto di sostanze che operano attraverso meccanismi epigenetici come per esempio l'induzione della proliferazione cellulare. Altri meccanismi prevedono un'azione genotossica indiretta realizzata attraverso l'attivazione di pretossici, premutageni e precancerogeni e/o mediante l'aumento dello stress ossidativo. In questo caso si parla di cancerogeni co-tossici, -mutageni e -cancerogeni (Paolini e altri, 1992 e 1994a).

Nella fase di progressione, il clone che deriva dalla cellula iniziata, spinto a proliferare ulteriormente dagli agenti promotori o da altri fattori, sviluppa infine un tumore maligno. Questo fenomeno biologico è correlato all'acquisizione di mutazioni addizionali come conseguenza della proliferazione di cellule che sono geneticamente instabili. Tali danni genetici si riflettono nella comparsa di sottopopolazioni cellulari che differiscono tra di loro per diverse caratteristiche fenotipiche quali l'invasività, la capacità di accrescimento e di formare metastasi, il cariotipo, la sensibilità agli ormoni, la risposta al sistema immunitario o ai farmaci antitumorali. Pertanto, sebbene l'origine della maggior parte delle neoplasie sia

monoclonale, quando un tumore diventa clinicamente evidente le cellule che lo compongono sono diventate estremamente eterogenee, più adatte ad eludere le difese dell'ospite e, pertanto, più aggressive (Schedin e altri, 2004).

1.2 Il ruolo del metabolismo nella cancerogenesi chimica

Le sostanze chimiche inizianti sono estremamente diverse dal punto di vista strutturale e comprendono sia prodotti naturali che prodotti di sintesi. Sono tuttavia accomunate dal fatto di essere sostanze elettrofile (possiedono cioè atomi privi di uno o più elettroni) altamente reattive, che possono reagire con componenti cellulari nucleofile (cioè ricche di elettroni) come DNA, RNA e proteine. Esse rientrano in due categorie:

- composti ad azione diretta, che per espletare la loro azione cancerogena non richiedono alcuna trasformazione chimica come gli agenti alchilanti e acilanti;
- composti ad azione indiretta o precancerogeni, che richiedono una conversione metabolica *in vivo* per dare origine a cancerogeni terminali capaci di trasformare le cellule (Das e altri, 2000).

La maggior parte dei cancerogeni inizianti rientra in quest'ultima categoria: idrocarburi aromatici policiclici; ammine aromatiche e coloranti azoici; nitrosammine e ammidi; agenti naturali come l'aflatossina B₁; cloruro di vinile; nichel, cromo, cadmio e i loro derivati; alcuni insetticidi e fungicidi. La loro conversione metabolica è realizzata dagli enzimi di fase I, II e III del *drug-metabolism*. In particolare, secondo una convenzione oramai superata, la bioattivazione dei procancerogeni a cancerogeni terminali è realizzata esclusivamente dal gruppo degli enzimi di fase I tra i quali principalmente il sistema monoossigenasico citocromo P450-dipendente. Il danneggiamento del DNA da parte dell'intermedio elettrofilo così generato è prevenuto però dall'attività degli enzimi di

fase II considerati esclusivamente detossificanti poichè in grado di inattivare gli intermedi reattivi attraverso un'ampia varietà di meccanismi, tra i quali la coniugazione con ligandi endogeni e di promuovere la loro escrezione (fig. 1.1). Ne consegue pertanto che il potere cancerogeno di una sostanza chimica è determinato non solo dalla reattività intrinseca del suo derivato elettrofilo, ma anche dall'equilibrio tra attivazione metabolica e reazioni di inattivazione (Talalay e Fahey, 2001).

1.3 I livelli di chemioprevenzione

Tipicamente esistono due approcci complementari per prevenire il cancro.

Il primo consiste nell'evitare o nel minimizzare l'esposizione ad un riconosciuto fattore di rischio per esempio attraverso l'adozione di un corretto stile di vita.

Il secondo, definito chemioprevenzione, contempla invece di inibire, ritardare o evitare il processo di cancerogenesi fin dalle sue fasi più precoci attraverso l'esposizione ad agenti chimici sintetici o naturali come farmaci, macronutrienti, micronutrienti o composti fitochimici non-nutrienti.

Sulla base del *target* di popolazione verso cui quest'ultimo approccio è destinato, si possono distinguere tre livelli di chemioprevenzione.

La chemioprevenzione primaria è rivolta ad individui sani ma a rischio, sia a causa di una forte predisposizione genetica o per via di massicce esposizioni ad agenti cancerogeni. In questo ambito, lo scopo dell'intervento chemiopreventivo è quello di inibire le fasi di iniziazione e promozione del processo di cancerogenesi attraverso meccanismi extra- ed intracellulari.

La chemioprevenzione secondaria è indirizzata a pazienti in fase preclinica e a individui affetti da lesioni precancerose. Il suo scopo è quindi quello di inibire la progressione del tumore benigno a maligno.

La chemioprevenzione terziaria è invece rivolta a individui affetti da cancro precedentemente sottoposti a chemioterapia ed è finalizzata a prevenire eventuali recidive, l'invasività o la capacità di formare metastasi del tumore (fig. 1.2). Sebbene quest'ultimo livello non abbracci in senso stretto la definizione di chemioprevenzione, viene tuttavia considerato per via del fatto che i meccanismi di prevenzione coinvolti coincidono con quelli sfruttati dagli agenti che intervengono nei due precedenti livelli di chemioprevenzione.

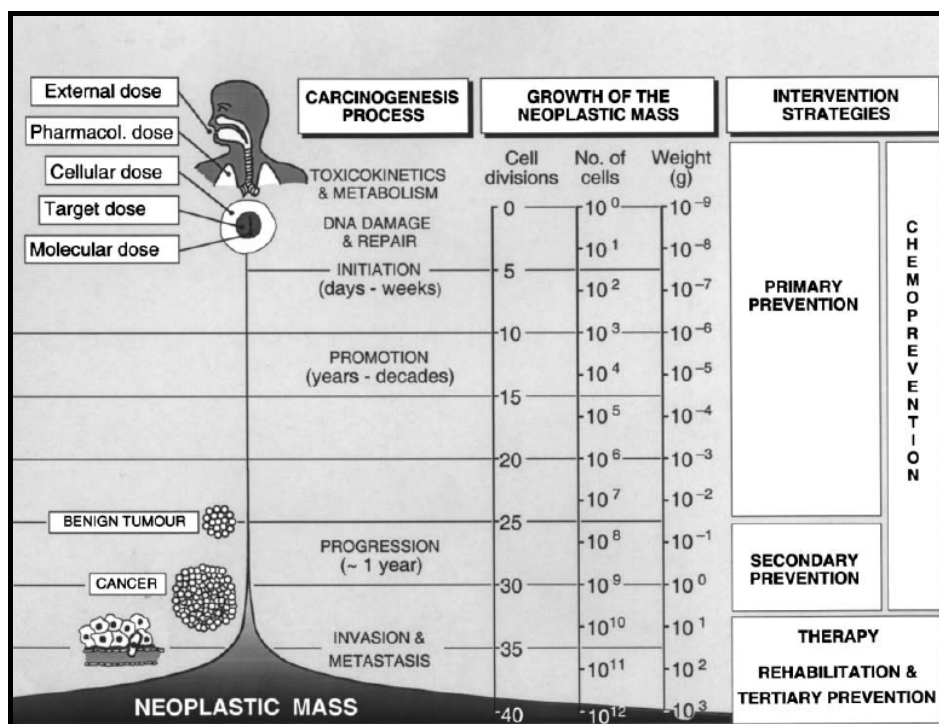


Figura 1.2. Interventi chemiopreventivi in relazione alla crescita della massa tumorale e alle fasi del processo di cancerogenesi.

Come ogni altro agente somministrato all'uomo, anche gli agenti chemiopreventivi devono possedere alcuni requisiti. E' importante che siano altamente efficaci e tollerabili, che abbiano un meccanismo d'azione noto in modo da poter essere distribuiti in tutta sicurezza su larga scala, che abbiano un basso costo e che siano pratici da utilizzare soprattutto per ciò che riguarda la via di somministrazione,

preferenzialmente orale, in virtù del fatto che l'esposizione agli agenti chemiopreventivi prevede tempi molto prolungati. Ovviamente nessun agente chemiopreventivo possiede contemporaneamente tutte queste caratteristiche: è necessario tener presente che l'importanza relativa di ciascun requisito dipende principalmente dallo scopo dell'intervento chemiopreventivo e dal *target* di popolazione verso cui quest'ultimo è indirizzato. Nell'ambito della chemioprevenzione terziaria è assolutamente indispensabile che l'agente impiegato presenti un'alta efficacia, nonostante tale requisito sia spesso controbilanciato da costi molto elevati, scarsa praticità d'uso e soprattutto effetti collaterali molto pesanti. Se il target chemiopreventivo è invece rappresentato da individui sani è necessario che l'agente sia soprattutto altamente tollerabile e scarsamente tossico (De Flora e altri, 2001 e 2005).

1.4 Classificazione degli agenti chemiopreventivi

L'attuale classificazione ricalca quella proposta nel 1985 da Wattenberg, basata sulla tempistica d'intervento degli agenti chemiopreventivi in modelli animali di cancro. Su tali basi gli agenti chemiopreventivi sono stati classificati come:

- inibitori della formazione del cancro;
- agenti bloccanti;
- agenti soppressori.

E' tuttavia necessario precisare che si tratta di una schematizzazione non rigida. Nessun agente chemiopreventivo è così specializzato da poter intervenire su di un unico bersaglio o in una sola fase della cancerogenesi: la maggior parte degli agenti chemiopreventivi mostra al contrario multipli meccanismi d'azione che danno origine ad una risposta pleiotropica.

1.4.1 Gli inibitori della formazione del cancro

Questi agenti agiscono molto precocemente nel processo di cancerogenesi in quanto prevengono la formazione dei cancerogeni. Il loro impiego rientra quindi nell'ambito della chemioprevenzione primaria.

Agiscono in ambiente extracellulare e il loro meccanismo d'azione è basato sull'inibizione della formazione di nitrosammine a partire da ammine secondarie e nitriti (reazione di nitrosazione) nell'ambiente acido dello stomaco. Una lista di tali composti è fornita nella tabella sottostante (Tab. 1.1)

Chemical class	Inhibitor
Reductive acids	Ascorbic acid
Phenols	Caffeic acid, ferulic acid, gallic acid
Sulfhydryl compounds	<i>N</i> -Acetylcysteine
Amino acids	Proline, thioproline

Tabella 1.1. Inibitori della formazione del cancro.

I nitrati (di sodio e di potassio) sono sali abbondantemente presenti nei vegetali e, insieme ai nitriti, vengono deliberatamente aggiunti a carni, salumi, pesci e latte per prevenire la crescita di *Clostridium botulinum*, che può essere letale se ingerito in dosi elevate.

I nitrati sono sali di per sè non tossici e non possono formare composti tossici, ma lo diventano nel momento in cui vengono trasformati in nitriti. Questa trasformazione avviene, per quanto riguarda i nitrati presenti nei vegetali, già nel cavo orale per opera dei batteri presenti.

I nitriti vengono ingeriti e giungono nello stomaco dove avviene la reazione di nitrosazione con le ammine presenti in altri cibi (cereali, formaggi, ecc.) dalla quale si formano le cosiddette nitrosammine che rappresentano un rischio cancerogeno certo e documentato. Le nitrosammine si possono formare solamente con i nitriti (non con i

nitriti), sia quelli aggiunti alle carni che quelli derivati dai vegetali e trasformati in bocca.

La funzione di alcune sostanze come la vitamina C, presente soprattutto nei vegetali a foglia verde, è quella di inibire la reazione di nitrosazione tra nitriti e ammine, impedendo la comparsa di nitrosammine proprio nello stomaco, dove queste agiscono più pericolosamente. Altre sostanze coinvolte in tale inibizione sono i fenoli come l'acido ferulico, gallico e caffeico e i composti sulfidrilici come l'N-acetilcisteina. Anche alcuni aminoacidi come la prolina e la tioprolina agiscono da inibitori della formazione del cancro in quanto sono in grado di reagire con i nitriti formando nitrosammine non mutageniche (Stoner e altri, 1997).

1.4.2 Gli agenti bloccanti

Gli agenti bloccanti sono inibitori della fase di iniziazione del processo di cancerogenesi e, conseguentemente, trovano impiego nell'ambito della chemioprevenzione primaria.

Poiché l'evento principale che segna l'iniziazione è il danno genotossico non letale al DNA, i meccanismi sfruttati da questi agenti chemiopreventivi sono fondamentalmente volti a preservare la fedeltà dell'informazione genetica. Su tali basi, gli agenti bloccanti vengono assegnati ad una delle seguenti categorie:

- *Interceptors* molecolari:

Si tratta di agenti in grado di sequestrare i cancerogeni all'interno di complessi molecolari inattivi. Un esempio è rappresentato dalla clorofillina. Quest'ultima è in grado di catturare le ammine eterocicliche all'interno di un complesso che non è in grado di attraversare le membrane e di conseguenza di formare addotti mutageni con il DNA (Tsuda e altri, 2004).

- Modulatore del sistema monoossigenasico citocromo P450-dipendente:

Questo meccanismo d'azione è basato sulla capacità di tale sistema di essere modulato, cioè indotto (*up-regulated*) o inibito (*down-regulated*), da esposizioni ambientali e nutrizionali che si è evoluta come risposta adattativa volta alla necessità di eliminare nel più breve tempo possibile lo stress cellulare derivante dall'esposizione agli xenobiotici. Poiché in base alla teoria chemiopreventiva classica il sistema monoossigenasico citocromo P450-dipendente è il principale responsabile della conversione delle molecole in intermedi elettrofili, i suoi inibitori rappresentano una valida strategia di prevenzione dei tumori. In questo ambito numerosi composti di origine vegetale si sono dimostrati molto validi: tra questi vanno ricordati gli isotiocianati, prodotti di idrolisi dei glucosinolati presenti nelle Brassicaceae, e i loro derivati ditiocarbammati che si sono mostrati molto efficaci nell'inibire l'induzione tumorale promossa dalle nitrosammine, la diallil sulfide presente nell'aglio, l'acido ellagico contenuto nel melograno che inibisce *in vitro* il metabolismo del benzo[a]pirene, *in vivo* e *in vitro* quello della nitrosammina NMBA e i tumori esofagei indotti da quest'ultima.

La consapevolezza che in realtà il sistema monoossigenasico citocromo P450-dipendente (così come gli enzimi di fase II e III) presentino una natura anche detossificante ha fatto sì che anche i suoi induttori venissero annoverati tra gli agenti chemiopreventivi sulla base della loro capacità di incrementare l'inattivazione ossidativa dei composti tossici o la produzione di metaboliti reattivi nei tessuti resistenti allo scopo di renderli più accessibili alle coniugazioni da parte degli enzimi di fase II. Fra questi bisogna ricordare l'indolo-3-carbinolo e il β -naftoflavone (Morse e altri, 1993; Stoner e altri, 1997).

Per una più dettagliata comprensione dei meccanismi d'azione dei modulatori del sistema monoossigenasico citocromo P450-dipendente e delle molteplici e complesse conseguenze associate all'alterazione dell'attività degli enzimi del *drug-metabolism*, si rimanda rispettivamente ai capitoli 3 e 7 del presente lavoro.

- Induttori degli enzimi di fase II:

Gli induttori degli enzimi di fase II vengono preferiti a quelli del sistema monoossigenasico citocromo P450-dipendente perché si pensa che inibiscano una più vasta gamma di cancerogeni e che il loro intervento sia associato a conseguenze meno dannose (Morse e altri, 1993; Stoner e altri, 1997).

In generale si può affermare che tali agenti possano essere ricondotti principalmente a sette classi di composti: gli accettori della reazione di Michael, difenoli e chinoni, isotiocianati, perossidi, mercaptani, arsenicali trivalenti e sali di metalli pesanti (Prester e altri, 1993).

Nonostante la grande varietà strutturale, si tratta di molecole accomunate dalla caratteristica di reagire con gruppi tiolici, considerati i sensori redox della cellula (Dinkova-Kostova e altri, 2002).

Anche in questo caso, per una più dettagliata comprensione, si rimanda ai capitoli 3 e 7 del presente lavoro.

- Agenti trappola per gli elettrofilo e i radicali liberi.

Si tratta di composti in grado di reagire fisicamente con le forme attive dei cancerogeni e i radicali liberi, come le specie reattive dell'ossigeno (ROS), spegnendone il potenziale nocivo.

Molti composti fitochimici introdotti con la dieta si sono mostrati validi agenti trappola. Tra questi vi è l'acido ellagico che è in grado di reagire con il dioloepossido del benzo[a]pirene per formare addotti non nocivi. Inoltre il gruppo sulfidrilico dell'N-acetilcisteina può reagire con specie elettrofile, capacità associata al suo potenziale antimutageno e anticancerogeno.

Le ROS sono generate da numerosi processi intracellulari: la respirazione aerobia, la risposta immunitaria, l'attività dei perossisomi e del sistema monoossigenasico citocromo P450-dipendente. Il danno indotto da tali molecole rappresenta uno dei maggiori fattori di rischio per lo sviluppo di patologie degenerative e cancro (Ames e altri, 1995). Il danno ossidativo al DNA (8-idrossideossiguanina, 2-idrossiadenina, 8-idrossiadenina, 5-idrossicitosina, ecc..) si viene a

generare in condizioni di saturazione dell'attività dei sistemi endogeni di riparo del DNA e dei meccanismi enzimatici e non che le cellule hanno sviluppato per rimuovere e minimizzare gli effetti dannosi delle ROS. In questo contesto, un apporto esogeno di agenti trappola costituisce un ulteriore livello di difesa: gli alimenti introdotti con la dieta ne rappresentano una considerevole fonte. Il β -carotene presente nella frutta di color arancione, i polifenoli della frutta e verdura di colore viola e la vitamina E particolarmente abbondante negli oli sono in grado di inattivare praticamente tutti i tipi di ROS (Stoner e altri, 1997).

- Induttori della riparazione del DNA:

Tali agenti sfruttano tre tipi di meccanismi. Il primo è rappresentato da un aumento generalizzato dei livelli di riparo del DNA: la vanillina appartiene a questa categoria.

Il secondo prevede l'aumento dell'attività della poli-(ADP-ribosil)-transferasi (ADPRT): la poli-ADP-ribosilazione è una modificazione post-traduzionale delle proteine nucleari in grado di regolarne attività e funzione. L'enzima ADPRT utilizza il NAD⁺ come substrato per produrre ADP-ribosio e trasferirlo su varie proteine, inclusa se stessa, con formazione e sviluppo del poli-ADPR, che può arrivare a consistere di venti unità. Alla base dell'intervento della ADPRT nei numerosi processi cellulari in cui è coinvolta vi è la presenza di punti di rottura nel DNA. La ADPRT, dopo aver riconosciuto una rottura nel DNA, vi si lega e si attiva; le proteine cromosomiche prossime alle interruzioni della doppia elica (ADPRT e istoni compresi) vengono ADP-ribosilate e allontanate dal DNA; si ha un rilassamento della superstruttura della cromatina che facilita l'accesso degli enzimi di riparazione del DNA (DNA elicasi A e DNA topoisomerasi I). L'N-acetilcisteina è in grado di prevenire il decremento di ADPRT indotto dal 2-acetilamminofluorene.

Il terzo è rappresentato dall'inibizione del riparo *error-prone* del DNA. Un'ampia varietà di strategie di riparo si sono evolute per il recupero delle informazioni perdute in seguito al danneggiamento del

DNA. Quando è possibile la cellula sfrutta il filamento complementare non danneggiato o il cromatidio fratello come stampo. Tuttavia, in mancanza di stampi accessibili, la cellula è comunque in grado di riparare il danno subito sfruttando un meccanismo di riparo *error-prone*, cioè non fedele all'originaria informazione genetica e quindi in grado di introdurre mutazioni all'interno del genoma. Gli inibitori delle proteasi interferiscono con questa strategia inattivando le proteasi, regolate positivamente dai promotori tumorali, che, a loro volta, sono responsabili della stimolazione del riparo *error-prone* del DNA (Stoner e altri, 1997).

1.4.3 Gli agenti soppressori

Gli agenti soppressori inibiscono le fasi di promozione e progressione tumorale e conseguentemente trovano impiego sia nella chemioprevenzione primaria che secondaria.

La grande varietà di eventi coinvolti in queste due tappe della cancerogenesi rendono difficoltosa un'esatta classificazione di questi agenti che, tuttavia, possono essere approssimativamente suddivisi nelle seguenti categorie:

- Inibitori del metabolismo delle poliammine:

Le poliammine naturali, putrescina, spermidina e spermina sono composti ubiquitari coinvolti nei processi di sviluppo cellulare, stimolano la sintesi proteica, la divisione cellulare e la sintesi di DNA e RNA. L'enzima chiave coinvolto nella loro sintesi è l'ornitina decarbossilasi che catalizza la formazione di putrescina, dalla quale si generano successivamente spermidina e spermina, a partire dall'ornitina. Alcuni promotori come gli esteri del forbolo agiscono proprio stimolando l'attività di questo enzima con un conseguente accumulo di poliammine nelle cellule tumorali. Gli inibitori del metabolismo delle poliammine come α -difluorometilornitina, i polifenoli del tè, l'acido ellagico e la curcumina (un pigmento naturale che rappresenta il principale componente attivo delle spezie di

curcuma) sopprimono la promozione indotta dagli esteri del forbolo inattivando l'ornitina decarbossilasi: a causa dell'elevato turnover di quest'ultima è necessario però che vengano mantenute concentrazioni costanti di tali inibitori per ottenere l'effetto antiproliferativo desiderato (Stoner e altri, 1997).

- Induttori del differenziamento cellulare:

Il differenziamento cellulare, capacità che le cellule neoplastiche perdono, è associato a livelli di proliferazione estremamente ridotti. In tale ottica i composti in grado di ripristinare il potenziale differenziativo di cellule neoplastiche in attiva proliferazione sono in grado di sopprimere il processo di cancerogenesi. Alcuni fra i più utilizzati sono la vitamina A e i retinoidi, il calcio e la vitamina D₃ (Stoner e altri, 1997).

- Modulatori delle vie di trasduzione (inibitori dell'attività degli oncogeni):

Le vie di trasduzione che regolano la proliferazione cellulare sono molto spesso alterate nelle cellule neoplastiche. Poiché si tratta di *pathway* costituiti da una grande varietà di elementi tra i quali fattori di crescita, gli ormoni e i loro recettori, proteine coinvolte nei meccanismi di trasduzione del segnale come le chinasi e ras, proteine che regolano la trascrizione nucleare come myc, AP-1 e NF-κB, regolatori del ciclo cellulare come cicline e chinasi ciclina-dipendenti (CDK), i loro modulatori offrono numerosi punti di interventi chemiopreventivi.

Gli agenti chemiopreventivi possono inibire la proliferazione di cellule neoplastiche inibendo (e meno frequentemente inducendo) l'attività di fattori di crescita e ormoni.

Per esempio il TGF-β ha attività antiproliferativa sia nelle cellule tumorali che in quelle sane e può anche indurre il differenziamento cellulare: gli agenti chemiopreventivi in grado di attivarlo o di stimolarne la sintesi possono controllare la proliferazione delle cellule cancerose. L'IGF-I, al contrario, stimola la proliferazione cellulare in molti tumori: le cellule di tumore mammario umano, per esempio,

sono in grado di sintetizzarlo e di impiegarlo in un *loop* autocrino di crescita. Il tamoxifene è in grado di abbassarne la concentrazione plasmatica e di agire quindi come agente bloccante. Questo farmaco, così come l'indolo-3-carbinolo, è inoltre in grado di regolare la dipendenza di molti tumori dagli ormoni: lega infatti il recettore nucleare per estrogeni prevenendo la proliferazione cellulare indotta da questi ultimi (Stoner e altri, 1997).

Anche il TNF è un potente fattore di crescita per molte cellule tumorali: il suo meccanismo d'azione sembra essere basato sulla generazione di un forte effetto proinfiammatorio. La stimolazione da parte del TNF infatti attiva il fattore trascrizionale NF-kB che, a sua volta, transattiva i geni per la COX-2, la lipossigenasi, le citochine e chemochine e per l'ossido nitrico sintasi inducibile. Alcuni potenti inibitori della sua azione sono rappresentati dalla curcumina, i polifenoli del tè verde, il gingerolo (contenuto nello zenzero) e il resveratrolo (un polifenolo presente soprattutto nell'uva e nel vino).

Altri fattori di crescita implicati nella cancerogenesi sono l'EGF, il PDGF, l'FGF, l'eritropoietina, l'IL-1, 2, 6, 8, l'INF- γ e il CSF: il loro forte stimolo proliferativo costituisce la base per l'insorgere delle fasi di promozione e proliferazione tumorale. Curcumina, resveratrolo ed epigallocatechina gallato, uno dei principali componenti della frazione polifenolica del tè verde, sono tutti potenti inibitori delle loro vie di segnalazione (Aggarwal e altri, 2006).

Le proteine chinasi sono un altro frequente bersaglio dell'attività inibitoria di questa categoria di agenti chemiopreventivi. Fra queste vi sono la PKC che viene regolata negativamente dalla staurosporina, dai flavonoidi e dall'acido glicirretinico presente nella liquirizia (Stoner e altri, 1997). La PI3K e la PKD sono altre chinasi coinvolte nei meccanismi di sopravvivenza e proliferazione cellulare: l'epigallocatechina gallato riduce la via di segnalazione attivate da queste chinasi (Surh, 2003). Un'altro *target* chemiopreventivo frequentemente deregolato nelle cellule tumorali è la chinasi Akt, la sua via porta alla sopravvivenza cellulare e all'inibizione dell'apoptosi

mediata dall'inattivazione di numerosi fattori proapoptotici tra cui Bad e la caspasi-9. Alcuni dei suoi più potenti inibitori sono rappresentati dalla genisteina (un isoflavone derivato dalla soia) e la curcumina. Anche le MAPK sono frequentemente bersaglio degli inibitori curcumina, indolo-3-carbinolo, resveratrolo e polifenoli del tè verde (Aggarwal e altri, 2006).

Fra le proteine coinvolte nei meccanismi di trasduzione del segnale, oltre alle chinasi, ras gioca un ruolo fondamentale. Alterazioni di questa proteina sono frequenti in molte forme tumorali. Le strategie chemiopreventive volte a minimizzare la sua attività prevedono l'impiego di agenti come il D-limonene o inibitori della farnesil protein transferasi per inibire la farnesilazione di ras, modificazione post-traduzionale che determina il reclutamento alla membrana e quindi l'attivazione di questo oncogene (Morse e altri, 1993).

Fra i fattori trascrizionali, i più frequenti bersagli dell'attività degli agenti chemiopreventivi sono NF-kB, AP-1 e STAT: si tratta di proteine che attivano la trascrizione di geni coinvolti nella trasformazione cellulare, nella soppressione dell'apoptosi, nella proliferazione e sopravvivenza cellulare. La loro espressione o attività è aberrante in molte forme tumorali. Numerosi composti fitochimici tra i quali la curcumina sono in grado di regolarne l'attività (Surh, 2003).

Infine, fra gli agenti bloccanti in grado di modificare il ciclo cellulare frequentemente deregolato nelle cellule tumorali sono stati annoverati curcumina, resveratrolo, genisteina, isotiocianati, apigenina (un flavonoide presente in numerosi alimenti) e silibinina (un composto fitochimico presente nel cardo) (Aggarwal e altri, 2006).

- Promotori della comunicazione intercellulare:

La comunicazione cellulare è mediata da *gap junctions*, canali proteici di comunicazione cellulare attraverso cui ioni e piccole molecole possono direttamente passare da una cellula all'altra. Si pensa inoltre che attraverso queste vie di comunicazione possono anche transitare segnali per la regolazione della crescita. In numerosi studi è stata

dimostrata una forte inibizione della comunicazione attraverso le *gap junctions* nelle cellule tumorali. Agenti come il β -carotene, la cantaxantina e retinoidi come la vitamina A sono in grado di aumentare la trascrizione della connessina (proteina che costituisce le *gap junctions*), proprietà correlata all'inibizione della trasformazione del cellule trattate (Stoner e altri, 1997).

- Induttori della risposta immunitaria:

Molte cellule tumorali sviluppano meccanismi che consentono loro di sfuggire o eludere il sistema immunitario di un ospite immunocompetente. Questa categoria di agenti chemiopreventivi agisce potenziando la risposta immunitaria attraverso una vasta gamma di meccanismi. Per esempio, l'acido retinoico è in grado di incrementare l'immunità cellulo-mediata e la citotossicità mediata dalle cellule *natural killer*. Su queste ultime agisce anche il selenio aumentando la loro capacità di uccidere cellule tumorali *in vitro*. La vitamina E inoltre stimola l'attività umorale, in particolare la produzione di IgG, e l'immunità cellulo-mediata (Stoner e altri, 1997).

- Induttori dell'apoptosi:

L'apoptosi o morte cellulare programmata è il meccanismo che le cellule impiegano per eliminare cellule in eccesso, danneggiate o anormali e rappresenta quindi un'ottima strategia per il controllo del cancro. Tuttavia in molte forme tumorali, le alterazioni genetiche che si verificano e lo stimolo fornito da promotori tumorali come gli esteri del forbolo e gli ormoni fanno sì che il bilancio tra morte e sopravvivenza cellulare sia a favore di quest'ultima. Una valida strategia chemiopreventiva è quindi rappresentata dal ripristino di questo bilancio attraverso il potenziamento del processo di apoptosi. Molti agenti chemiopreventivi raggiungono tale scopo modulando negativamente NF-kB che agisce bloccando il *pathway* apoptotico, altri agiscono invece in modo diretto inibendo l'espressione di proteine coinvolte nella soppressione dell'apoptosi (Aggarwal e altri, 2006).

- Modificatori della metilazione sbilanciata del DNA:

La metilazione del DNA è una modificazione covalente dei nucleotidi citosinici catalizzata da un gruppo di enzimi noti come DNA metiltransferasi coinvolti nella regolazione trascrizionale dei geni. Le cellule maligne molto frequentemente presentano *patterns* di metilazione alterati. In generale l'ipermetilazione è associata all'inibizione trascrizionale e nella cellule cancerose caratterizza geni associati alla regolazione del ciclo cellulare, geni coinvolti nei meccanismi di riparazione del DNA, nell'apoptosi e nel differenziamento cellulare. I polifenoli del tè verde e i bioflavonoidi inibiscono le DNA metiltransferasi e conseguentemente sopprimono il silenziamento genico indotto dall'ipermetilazione.

L'ipometilazione è un altro difetto del *pattern* di metilazione molto frequente nella cellule tumorali ed è associato ad un aumento del grado di malignità delle neoplasie attraverso l'attivazione trascrizionale di oncogeni (come myc e ras) e di retrotrasposoni latenti o mediante l'induzione di instabilità cromosomica (Das e altri, 2004).

- Inibitori della degradazione della matrice extracellulare:

Come è noto, i tessuti sono organizzati in una serie di compartimenti separati da due tipi di matrice extracellulare: la membrana basale e il tessuto connettivo interstiziale. Entrambe queste componenti sono costituite da collagene, glicoproteine e proteoglicani. L'invasione della matrice extracellulare è un processo necessario per i meccanismi di invasione locale e metastatizzazione che le cellule tumorali realizzano attraverso la secrezione di proteasi (seriniche, cisteiniche e metalloproteasi della matrice). Tutti gli inibitori delle proteasi agiscono quindi come agenti soppressori interferendo con l'attività di tali enzimi proteolitici (Morse e altri, 1993).

- Inibitori del metabolismo dell'acido arachidonico:

Un aberrante metabolismo dell'acido arachidonico è la causa dello stato di infiammazione che accompagna il processo di cancerogenesi. L'acido arachidonico, derivato dai fosfolipidi e dai diacilgliceroli di membrana, viene metabolizzato attraverso due vie principali: quella della lipossigenasi che porta alla formazione di leucotrieni e quella

della prostaglandina sintasi (di cui la ciclossigenasi è una componente) che genera la prostaglandina H_2 , precursore di prostaciline, altre prostaglandine e trombossani.

Gli eicosanoidi generati da queste due vie sono ormoni locali (a causa della loro breve emivita) che stimolano il processo di infiammazione. In tale contesto, inibitori delle ciclossigenasi (in particolare dell'isoforma 2 inducibile) come le catechine del tè verde, la genisteina, la curcumina, il resveratrolo e delle lipossigenasi come i polifenoli del tè verde e nero, flavonoli, resveratrolo, vitamina E sono forti inibitori di tutte le fasi del processo di cancerogenesi. A tale riguardo vanno inoltre citati gli inibitori dell'ossido nitrico sintasi inducibile come il resveratrolo, l'indolo-3-carbinolo e l'epigallocatechina gallato: la persistente produzione di ossido nitrico è infatti collegata al processo di infiammazione e conseguentemente a quello di cancerogenesi (Aggarwal e altri, 2006).

- Alle summenzionate categorie è necessario inoltre aggiungere gli attivatori della funzione dei geni oncosoppressori, gli inibitori dell'angiogenesi e gli attivatori dei geni antimetastasi (Stoner e altri, 1997).

CAPITOLO 2

GLI ENZIMI DEL *DRUG-METABOLISM*

2.1 Introduzione

L'uomo è costantemente esposto ad una grande varietà di composti estranei detti xenobiotici – sostanze esogene di origine naturale o di sintesi assorbite dall'ambiente attraverso i polmoni o la pelle o, più comunemente, ingerite sia involontariamente che deliberatamente a scopo terapeutico o voluttuario. Rientrano in tale categoria agenti inquinanti, pesticidi, tossine, metaboliti di origine vegetale, additivi alimentari e farmaci.

In generale, la caratteristica che accomuna tali molecole è la lipofilia e la quasi totale assenza di cariche elettriche a pH fisiologico. Tali proprietà facilitano il loro assorbimento, ma, in assenza di sistemi di metabolizzazione che li rendano suscettibili di un'efficace eliminazione, l'esposizione a tali sostanze potrebbe risultare nell'accumulo dello xenobiotico e quindi in una sua prolungata azione all'interno dell'organismo.

Nel corso dell'evoluzione, per far fronte alla necessità di eliminare questi composti, si è sviluppato un sistema di reazioni metaboliche di biotrasformazione che ha lo scopo di trasformare gli xenobiotici in prodotti maggiormente polari più facilmente eliminabili per escrezione e quindi, in generale, di proteggere l'organismo dalla prolungata esposizione a sostanze potenzialmente dannose. Per tale motivo viene spesso indicato come un “sistema di detossificazione”.

Tali reazioni sono catalizzate da una batteria di enzimi classificati in tre fasi:

- fase I o di funzionalizzazione;
- fase II o di coniugazione (Meyer, 1996);
- fase III o di deconiugazione e trasporto (fig. 2.1) (Liska, 1998).

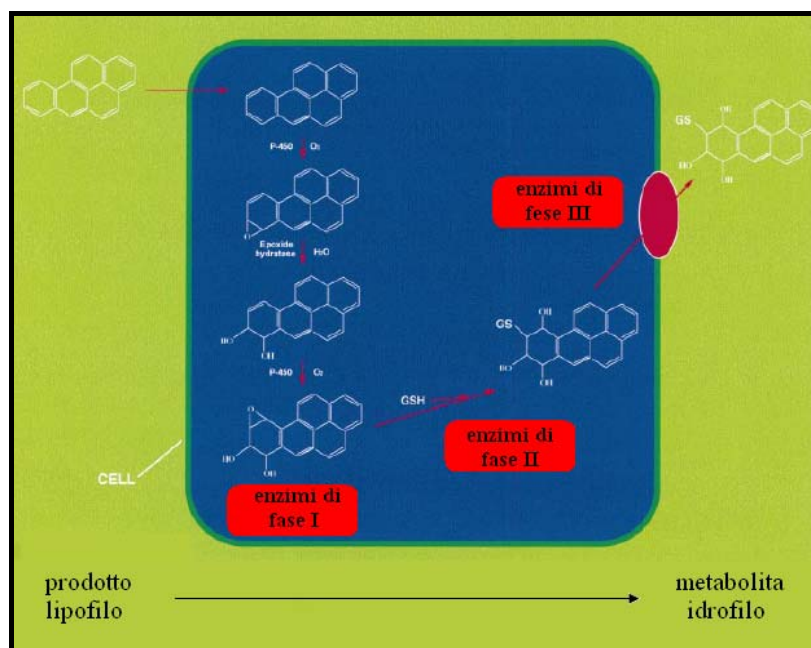


Figura 2.1. Le tre fasi di biotrasformazione degli xenobiotici.

2.2 Caratteristiche degli enzimi di fase I, II e III

Sebbene ogni tessuto sia dotato di una certa capacità di metabolizzare gli xenobiotici, il fegato è la sede principale del metabolismo. Altri tessuti, tra cui il tratto gastrointestinale, i polmoni, i reni, la cute, le ghiandole surrenali, il cervello, i testicoli e la placenta possiedono notevole capacità metabolizzante. Si tratta quindi di un sistema enzimatico ubiquitario espresso ad elevate concentrazioni cellulari nei principali siti di esposizione agli xenobiotici. A livello subcellulare, questi enzimi sono prevalentemente localizzati nella membrana del reticolo endoplasmico liscio (REL) microsomiale (fig. 2.2), ma sono individuabili anche in quelle dei mitocondri, nella membrana nucleare, nel citoplasma e in misura minore anche nei lisosomi e nel plasmalemma.

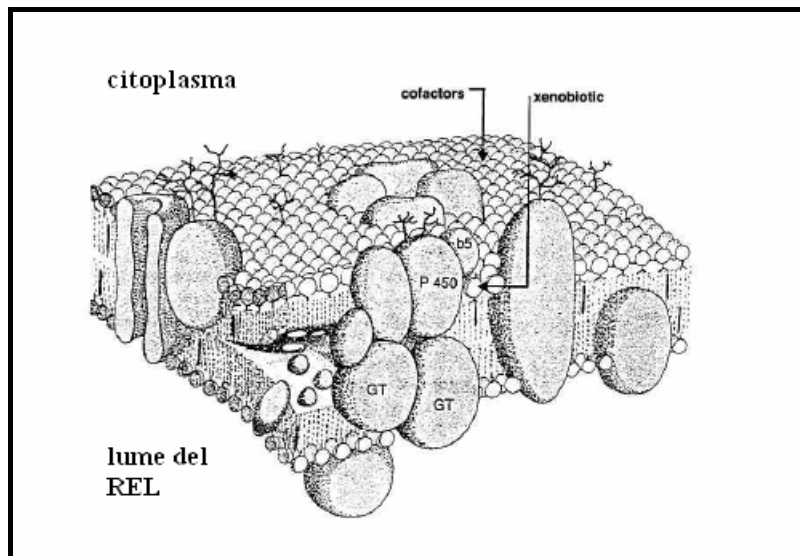


Figura 2.2. Localizzazione subcellulare degli enzimi di fase I (P450) e II (GT, glucuroniltransferasi) nella membrana del REL.

L'attività di tali enzimi non è limitata al metabolismo degli xenobiotici, numerose sono infatti le funzioni cellulari e sistemiche in cui sono coinvolti in virtù della capacità di riconoscere anche una vasta gamma di substrati endogeni. Tra questi ultimi sono annoverati ormoni steroidei, colesterolo, acidi biliari, acidi grassi, vitamina A e D, prostaglandine e altri eicosanoidi (Orellana e altri, 2004).

Da tali caratteristiche risulta evidente che, a differenza della ristretta selettività di substrato che contraddistingue gli enzimi classici, gli enzimi del *drug-metabolism* sono in grado di interagire con substrati di diverse forme, dimensioni e caratteristiche stereochimiche. Ma nonostante ciò, la formazione dei metaboliti risulta essere regio- e stereospecifica: l'interazione tra substrato ed enzima è quindi estremamente specifica nonostante l'ampia varietà di composti riconosciuti (Scott, 2003).

Come anticipato precedentemente, le reazioni di fase I sono anche chiamate di funzionalizzazione perché hanno la finalità di introdurre o mettere in evidenza gruppi funzionali (-OH, -SH, -NH₂ o -COOH) che trasformano i composti iniziali in metaboliti più polari. Questi ultimi

possono essere prontamente escreti o, più frequentemente, subire una successiva reazione nella quale un substrato endogeno idrofilo reagisce con il neoformato gruppo funzionale. Queste reazioni di coniugazione sono il segno distintivo della fase II del metabolismo. E' attraverso questa fase che la molecola assume le caratteristiche di idrosolubilità e di possibile ionizzazione al pH fisiologico dell'organismo, utili per accelerarne l'eliminazione.

Le reazioni di fase III sono meno note e comprendono reazioni intestinali e citoplasmatiche in grado di sovvertire completamente i processi di fase I e II e reazioni di trasporto extracellulare. Queste ultime sono catalizzate da proteine transmembrana che agiscono da pompe in grado di trasportare composti metabolizzati e non al di fuori della cellula diminuendone la concentrazione intracellulare (fig. 2.3) (Orellana e altri, 2004).

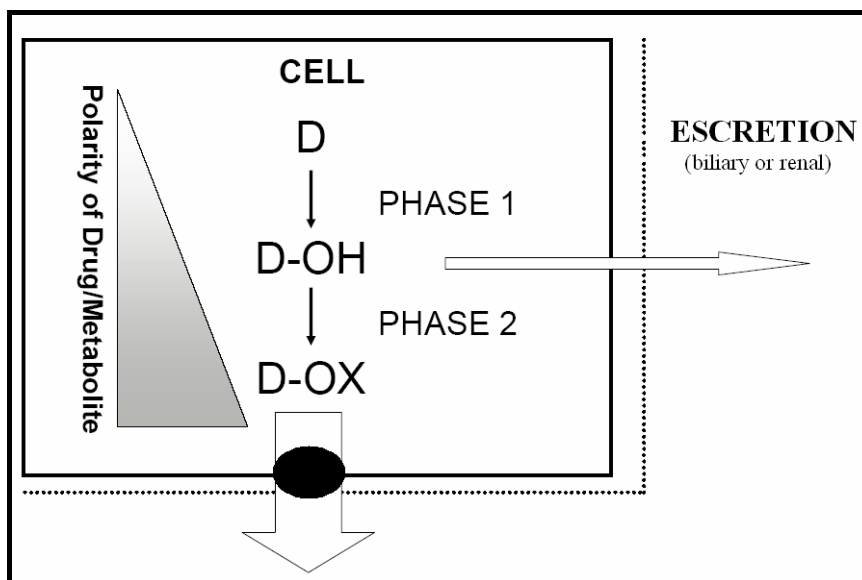


Figura 2.3. Il substrato D, una volta all'interno della cellula, va incontro alle reazioni di fase I (nell'immagine l'incorporazione/smascheramento del gruppo -OH). Dopo tale biotrasformazione può essere escretato (nelle urine o nella bile) oppure subire le reazioni di fase II (nell'immagine la coniugazione con il substrato endogeno X). Infine viene trasportato al di fuori della cellula dagli enzimi di fase III.

La gamma di effetti che le summenzionate reazioni di biotrasformazione possono avere sui loro substrati è molto ampia. I metaboliti possono infatti essere privi dell'attività farmacologica caratteristica dell'iniziale composto attivo. Altre volte la metabolizzazione può dare origine a composti farmacologicamente attivi o dotati di uno spettro farmacologico almeno parzialmente sovrapponibile a quello del composto d'origine. Non è raro il caso in cui la biotrasformazione porti alla formazione di composti privi di attività farmacologica ma dotati di attività tossica rispetto allo xenobiotico iniziale meno o affatto nocivo. Vi è infine la possibilità che il farmaco non sia di per sé attivo (profarmaco) ma che lo diventi solo dopo biotrasformazione (Fuccella, 1998).

2.3 Enzimi e sistemi di fase I

La fase I comprende 3 tipi principali di reazioni: ossidazioni, riduzioni e idrolisi (Tab. 2.1).

- Le ossidazioni: rappresentano, in termini quantitativi, il gruppo più importante di reazioni. Gli enzimi coinvolti sono in grado di intervenire in numerosi tipi di reazione di ossidazione: idrossilazione aromatica e alifatica; epossidazione; N-, O-, S-dealchilazione ossidativa; deamminazione ossidativa; ossidazione di mono- e diammine; S- e N-ossidazione (di ammine primarie, secondarie e terziarie); desulfurazione; dealogenazione ossidativa; alcol e aldeidi deidrogenazione; ossidazione di purine.

Il sistema monoossigenasico citocromo P450-dipendente (o ossidasi a funzione mista) e il sistema delle amminossidasi a funzione mista (flavin-monoossigenasi o FMO) non solo rappresentano i due enzimi maggiormente implicati nelle reazioni di ossidazione, ma apportano (soprattutto il sistema monoossigenasico) il maggior contributo al metabolismo degli xenobiotici (fig. 2.4) (Guengerich, 2006). Per

questo motivo e per il fatto di essere l'oggetto di studio del presente lavoro verranno trattati più estesamente di seguito.

Type of reaction	Substrate	Metabolite(s)
A. oxidations		
aromatic hydroxylation		
aliphatic hydroxylation	$R-CH_3$	$R-CH_2OH$
epoxidation	$R-C=C-R'$ $\quad \quad \quad $ $\quad \quad H \quad H$	
N-hydroxylation		
O-dealkylation	$R-O-CH_3$	$ROH + CH_3O$
N-dealkylation	$R-NHCH_3$	$R-NH_2 + CH_3O$
S-dealkylation	$R-S-CH_3$	$R-SH + CH_3O$
deamination	$R-CH(NH_2)-CH_3$	$R-C(=O)-CH_3 + NH_3$
S-oxidation	$R-S-R'$	$R-S(=O)-R'$
dechlorination	CCl_4	$[CCl_3] \rightarrow CHCl_3$
oxidative desulfuration		
II amine oxidation	$R-CH_2-NH_2$	$R-CHO + NH_3$
III dehydrogenation	CH_3-CH_2-OH	$CH_3CHO \quad CH_3COOH$
B. reductions		
azoreduction	$R-N=N-R'$	$R-NH_2 + R'-NH_2$
nitroreduction	$R-NO_2$	$R-NH_2$
carbonyl reduction	$R-C(=O)-R'$	$R-CH(OH)-R'$
C. hydrolyses		
esters	$R-C(=O)-O-R'$	$R-C(=O)-OH + R'-OH$
amides	$R-CONH_2$	$R-COOH + NH_3$

Tabella 2.1. Le principali reazioni di fase I.

- Le riduzioni. Sono quantitativamente meno importanti e meno studiate rispetto alle reazioni ossidative. Anche in questo caso i tipi di reazioni effettuate sono innumerevoli: azo-, nitro- e carbonil riduzione; riduzione di arene-ossidi; dealogenazione riduttiva; riduzioni di aldeidi e chetoni; riduzione di solfosfidi e di disolfuri.

Alcuni fra gli enzimi coinvolti sono: l'alcol-ossido reduttasi, l'aldeide reduttasi e la cheto reduttasi. Fra le azo- e nitroriduzioni alcune possono essere catalizzate dal sistema monoossigenasico citocromo P450-dipendente come pure da enzimi flavoproteici.

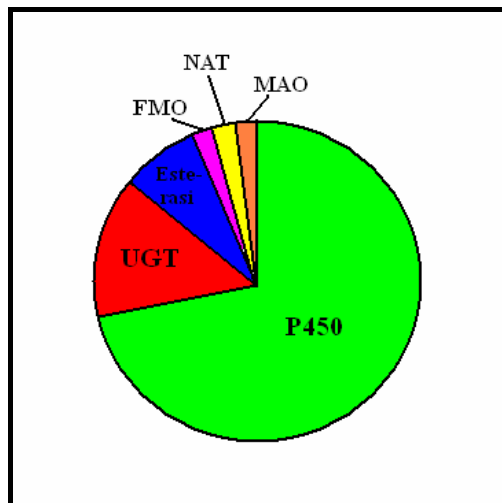


Figura 2.4. Contributo dei diversi sistemi enzimatici al metabolismo degli xenobiotici. Come si può notare il sistema monoossigenasico citocromo P450-dipendente è quello maggiormente coinvolto. UGT: UDP-glucuroniltransferasi; FMO: flavin-monoossigenasi; NAT: N-acetiltransferasi; MAO: monoamminossidasi.

- Le idrolisi. Sono presenti sia in fase I che in fase III del metabolismo. I principali tipi di idrolisi riguardano esteri, ammidi, glucosidi (in particolare quelli cardioattivi come la digitossina) e contaminanti ambientali come gli organofosfati.

Le reazioni di idrolisi sono catalizzate da numerosi enzimi presenti nel plasma ed anche nella frazione microsomiale del fegato e degli altri organi. Le esterasi e le peptidasi presenti nella mucosa gastroenterica possono poi essere responsabili di reazioni pre-sistemiche che convertono molecole inattive in prodotti attivi (Fuccella e altri, 1998).

2.4 Il sistema monoossigenasico citocromo P450-dipendente

Si tratta di uno dei più ampi complessi multienzimatici diffusi in tutte le classi di organismi. Dai batteri agli uomini, la sua diversità funzionale è del tutto insolita. Nei procarioti partecipa alla sintesi di numerosi antibiotici e catalizza numerose reazioni di biorisanamento

ambientale; nei funghi è coinvolto nella sintesi dell'ergosterolo e nella patogenesi; nelle piante interviene nell'anabolismo di fitormoni, pigmenti e fitoalessine; negli artropodi partecipa a numerosi meccanismi di resistenza metabolica e a innumerevoli funzioni cellulari; ma è il suo coinvolgimento nel metabolismo endogeno ed esogeno dei mammiferi come enzima di fase I che suscita il maggiore interesse (Danielson, 2002).

L'attività di questo sistema richiede l'interazione di due proteine: un'emoproteina chiamata citocromo P450 (CYP) e il suo *partner* redox. In base alla natura di quest'ultimo, i CYP vengono classificati in 4 differenti classi principali.

La classe I è particolarmente abbondante nei batteri e nelle membrane mitocondriali degli eucarioti e interagisce con reduttasi contenenti FAD (putidaredossina reduttasi, terpredossina reduttasi, adrenossina reduttasi, ecc..) ed una proteina ferro-zolfo (putidaredossina, terpredossina, adrenossina, ecc..). In questo caso molto spesso si parla di sistema a tre componenti

La classe II, oggetto di studio del presente lavoro, è rappresentata dai CYP microsomiali degli eucarioti e costituisce un sistema a due componenti con il *partner* redox NADPH citocromo P450 reduttasi.

La classe III comprende i CYP che non richiedono una fonte esogena di elettroni in quanto utilizzano substrati già contenenti ossigeno.

La classe IV di CYP riceve gli elettroni direttamente dai nucleotidi piridinici senza l'intervento di alcun *carrier* elettronico (Mestres, 2005).

Diversi aspetti dei CYP di classe II sono trattati più dettagliatamente di seguito.

2.4.1 L'evoluzione dei CYP

I citocromi P450 costituiscono una superfamiglia di emoproteine prevalentemente microsomiali e mitocondriali diffusa, come anticipato precedentemente, in tutte le classi di organismi viventi. Si

pensa, quindi, che i geni per gli attuali CYP si siano originati da una sequenza nucleotidica ancestrale esistita 3500 milioni di anni fa, prima della divergenza di *Bacteria*, *Archea* ed *Eukarya* e dell'avvento di un'atmosfera ricca di ossigeno.

A partire da questa situazione ancestrale, il motore per lo sviluppo dei CYP sono stati gli svariati cambiamenti ambientali che hanno caratterizzato la storia evolutiva, per esempio l'avvento di un'atmosfera aerobia circa 2500 milioni di anni fa, situazione in cui i CYP avrebbero iniziato ad agire come nitroreduccasi o endoperossido isomerasi proteggendo le prime forme di vita dalla tossicità dell'ossigeno.

In seguito, episodi di espansione su larga scala conseguenti ad eventi di duplicazione genomica e genica e di divergenza hanno caratterizzato l'evoluzione di queste emoproteine portando alla formazione di un arsenale di enzimi funzionali indispensabili per la ricerca di nuove fonti alimentari e l'esplorazione di nicchie ambientali sconosciute.

Circa 1500 milioni di anni fa si sarebbe verificato il primo evento di espansione con la generazione di isoforme inizialmente coinvolte esclusivamente nel metabolismo di acidi grassi, colesterolo e altri steroidi finalizzato al mantenimento dell'integrità di membrana dei primi eucarioti.

Solo più recentemente con le due successive ondate di espansione genica 1200 e 400 milioni di anni fa i CYP acquisiscono la capacità di metabolizzare gli xenobiotici, attività sviluppata principalmente come estensione della loro principale funzione nel metabolismo endogeno.

Nell'ambito di queste due ultime espansioni, un ruolo fondamentale è stato giocato dagli organismi vegetali. Circa 1200 milioni di anni fa, infatti, piante e animali divergono e questi ultimi iniziano a ingerire i primi organismi vegetali. Questa interazione si intensifica 400 milioni di anni fa quando gli animali emergono dall'acqua e iniziano a nutrirsi delle prime piante terrestri. Come mezzo di difesa, queste ultime sviluppano una grande quantità di CYP per la sintesi di fitoalessine

tossiche in grado di renderle una fonte di cibo meno appetibile. A loro volta, gli animali evolvono nuovi CYP per detossificare tali composti (la cosiddetta guerra tra piante e animali). L'ipotesi che questo meccanismo co-evolutivo tra piante e animali sia responsabile dello sviluppo di una superfamiglia così ampia di proteine è confermata dal fatto che, tra tutti gli organismi viventi, animali e piante posseggono il maggior numero di geni che codificano per i CYP (l'uomo ne ha 57, *Arabidopsis thaliana* ben 273).

L'analisi filogenetica suggerisce inoltre che, attualmente, il CYP rappresenta una delle superfamiglie di geni in più rapida evoluzione, caratteristica che asseconda la necessità degli organismi viventi di far fronte a condizioni ambientali in continuo cambiamento (Gonzalez e altri, 1990).

2.4.2 La nomenclatura dei CYP

Il nome "citocromo P450" deriva dalle caratteristiche dello spettro di assorbimento di queste emoproteine e in particolare del loro gruppo prostetico eme che è un forte cromoforo. Il gruppo eme è costituito da una parte organica e da un atomo di ferro. La parte organica, la protoporfirina IX, è costituita da quattro anelli pirrolici, legati tra di loro da ponti metilenici a formare un anello tetrapirrolico. A quest'ultimo sono legati quattro gruppi metilici, due vinilici e due propionici. Nell'eme, l'atomo di ferro si lega ai quattro atomi di azoto disposti nel centro dell'anello protoporfirinico (fig. 2.5), ma può formare altri due legami addizionali, uno su ciascun lato dell'eme. Questi siti di legame sono denominati quinta e sesta posizione di coordinazione.

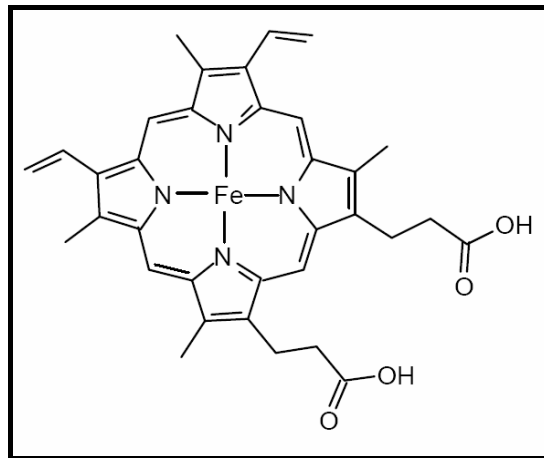


Figura 2.5. Il gruppo prostetico eme (Fe-protoporfirina IX) dei CYP.

Le caratteristiche spettroscopiche del gruppo eme dei CYP sono influenzate da diversi fattori tra cui l'intorno chimico che circonda il gruppo prostetico, lo stato di ossidazione dell'atomo di ferro, l'occupazione della quinta e sesta posizione di coordinazione e lo stato di spin del ferro. Quest'ultimo fattore indica se il ferro è coordinato o meno a un ligando in sesta posizione di coordinazione: un basso stato di spin indica che l'atomo di ferro è esacoordinato, mentre un alto stato di spin suggerisce che è pentacoordinato. Nei CYP il cambiamento nello stato di spin si può verificare come conseguenza del legame del monossido di carbonio (CO) al sesto sito di coordinazione, proprietà che i CYP acquisiscono in seguito alla riduzione del ferro a ione ferroso (Fe^{2+}). Il complesso CO-citocromo ferroso, rispetto alla forma ossidata libera, presenta un caratteristico picco di assorbimento compreso tra 447 e 452 nm (fig. 2.6).

Questo caratteristico massimo di assorbimento è dovuto alla presenza di un ligando inusuale in quinta posizione di coordinazione: si tratta di uno zolfo deprotonato di un residuo di cistina ($\text{Fe}^{2+}\text{-S-cys}$) (fig. 2.7A) che si trova in orientazione trans rispetto al CO (fig. 2.7B) e che, in tutte le altre emoproteine (per esempio mio- ed emoglobine), è sostituito da un atomo di azoto dell'anello imidazolico di un residuo di

istidina che conferisce un massimo di assorbimento a 420 nm (Danielson, 2002).

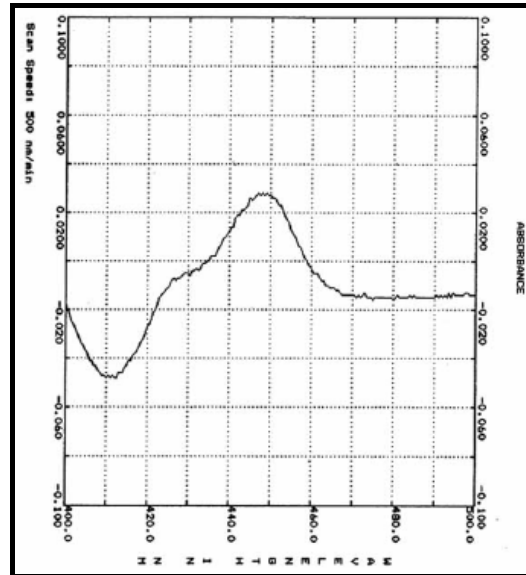


Figura 2.6. Spettro differenziale: caratteristico picco dei CYP a 450 nm (447-452 nm).

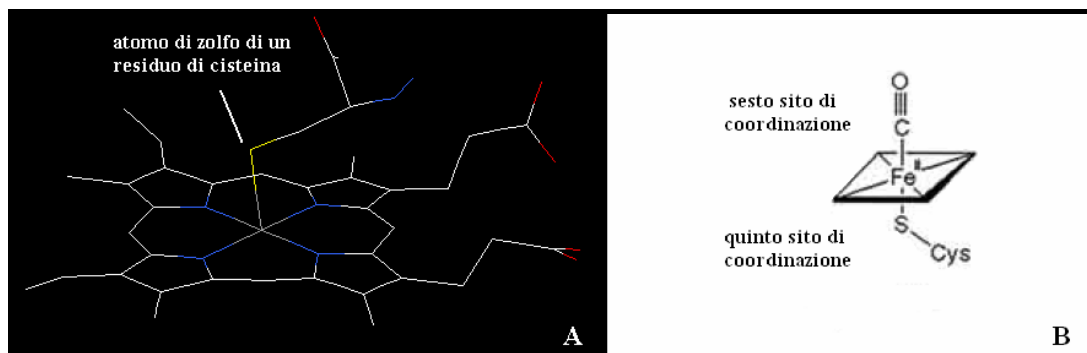


Figura 2.7. Zolfo deprotonato di un residuo di cisteina (A) che si trova in orientazione trans rispetto al CO (B).

La nomenclatura delle diverse isoforme di CYP è basata sull'omologia di sequenza aminoacidica:

- le proteine che presentano un'omologia minore del 40% definiscono le differenti famiglie indicate da un numero che segue immediatamente la sigla CYP (es. CYP1);

- le proteine che mostrano un'omologia compresa tra il 40-55% sono classificate come membri di diverse sottofamiglie. Queste ultime sono rappresentate da una lettera maiuscola che segue il numero concernente la famiglia (es. CYP1A);
- quando l'omologia è maggiore del 55% allora si tratta di isoforme appartenenti alla stessa sottofamiglia che vengono indicate da un numero che segue la sottofamiglia (es. CYP1A1) (Nebert e altri, 1991).

2.4.3 La struttura dei CYP e della NADPH citocromo P450 reduttasi

Nonostante la grande quantità di CYP che si sono evoluti, l'ampio numero di substrati riconosciuti e un'identità di sequenza non superiore al 10-30%, i CYP presentano domini proteici, elementi di struttura secondaria e ripiegamento terziario piuttosto conservati.

Tutti i CYP sono proteine transmembrana di 400-500 aminoacidi dotate di un'unica lunga α elica N-terminale che ancora la proteina alla membrana del REL e di un *core* catalitico che sporge nel citoplasma (fig 2.8).

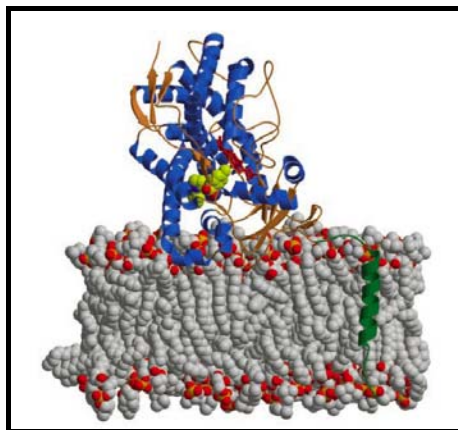


Figura 2.8. L' α elica N-terminale (in verde) ancora i CYP nella matrice fosfolipidica del REL mentre il *core* catalitico (in blu e arancione) sporge nel citoplasma cellulare. La reduttasi è caratterizzata da un'organizzazione strutturale molto simile.

Il *core* catalitico presenta elementi di struttura secondaria α e β che vengono contraddistinti da lettere latine (A-L) e lettere greche seguite da numeri, rispettivamente (fig. 2.9) (Degtyarenko, 1995).

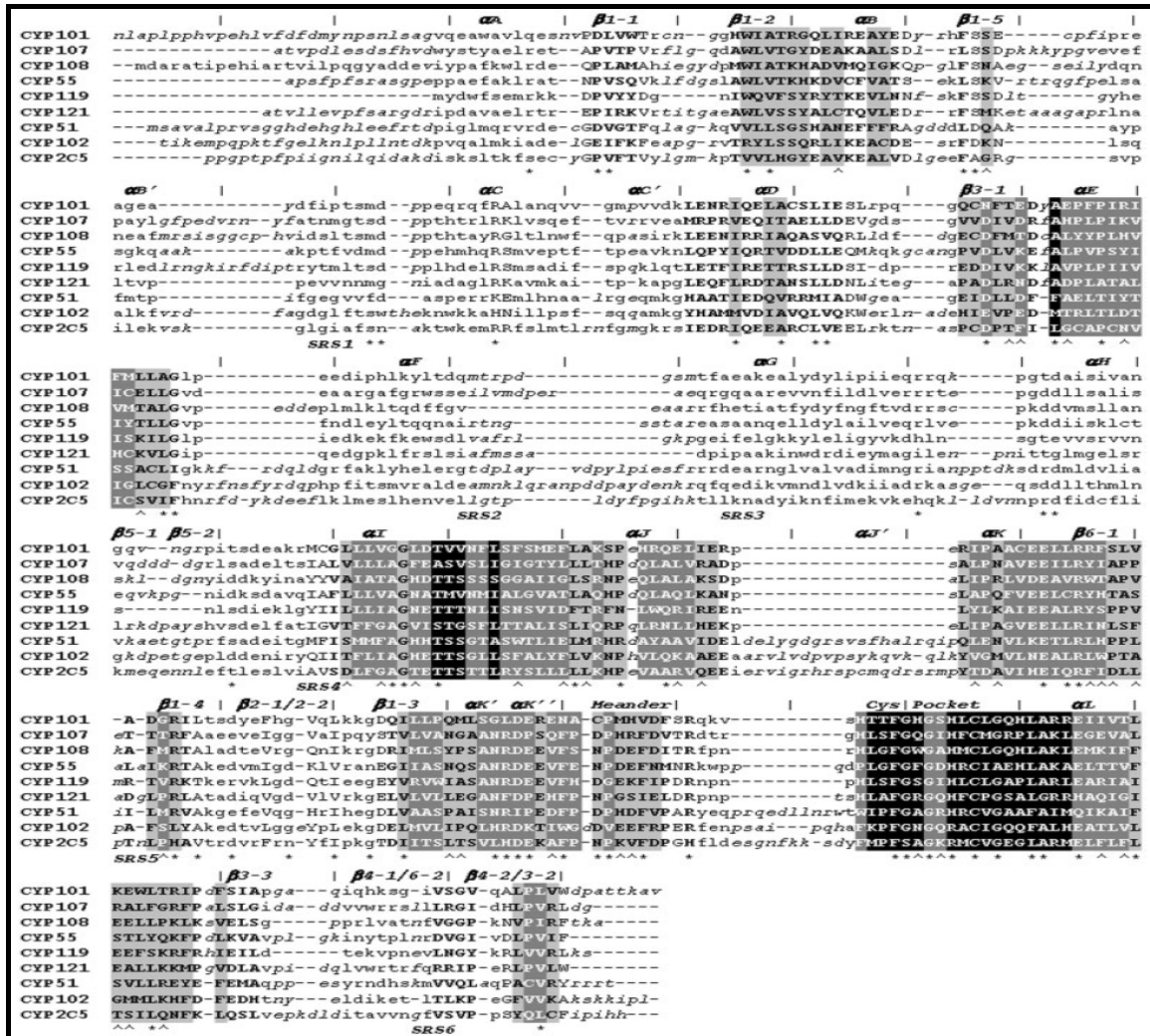


Figura 2.9. Allineamento della sequenza di 9 diversi CYP. Al di sopra delle sequenze sono riportati gli elementi di struttura secondaria α e β , indicati consecutivamente a partire dall'N-terminale con lettere latine e lettere greche seguite da numeri, rispettivamente; al di sotto sono mostrate le SRS numerate da 1 a 6.

Tali α -eliche e foglietti β sono organizzati a formare una struttura globulare di forma triangolare altamente conservata tra tutti i CYP.

Per convenzione, a tale struttura globulare sono state attribuite due facce:

- la faccia distale: è la porzione di proteina che si trova di fronte al sesto sito di coordinazione occupato, durante la catalisi, da ossigeno molecolare che, insieme al NADPH, costituisce l'elemento fondamentale per la reazione di ossidazione;
- la faccia prossimale: è la parte di proteina di fronte al quinto sito di coordinazione occupato dall'atomo di zolfo di un residuo di cisteina altamente conservato.

Fra queste due superfici giace il gruppo eme che è coordinato sul versante distale dall' α elica I mentre su quello prossimale dall' α elica L che è preceduta dalla sequenza consenso FXXGXXXCXG contenente il residuo di cisteina (altamente conservato) che occupa il 5 sito di coordinazione dell'eme.

La superficie distale (fig. 2.10) rappresenta il sito di interazione con il substrato che, in tal modo, si viene a trovare in prossimità dell'ossigeno e può essere facilmente idrossilato.

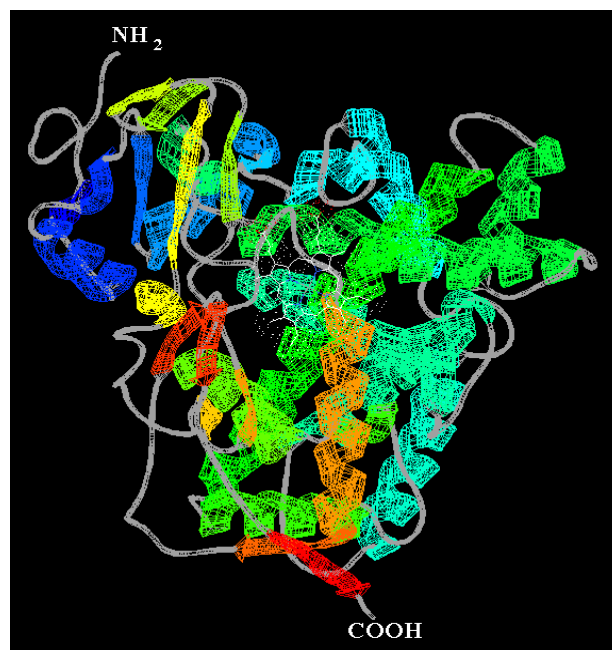


Figura 2.10. Faccia distale del CYP2C5 coinvolta nel legame del substrato.

I substrati vengono posizionati nel sito attivo da diverse porzioni della catena polipeptidica. Tali parti sono definite siti di riconoscimento del substrato (SRS) e in ciascun CYP sono numerate da 1 a 6 (fig. 2.9): l'SRS1 è situata tra le eliche B' e C, l'SRS2 e l'SRS3 si trovano rispettivamente in corrispondenza dell'elica F e G, l'SRS4 è posizionata a ridosso dell'elica I, l'SRS5 si trova tra i foglietti β_{6-1} e β_{1-4} , l'SRS6 cade fra i foglietti β_{4-1} e β_{4-2} . Nel complesso, le SRS danno origine ad una cavità ampia, di natura idrofobica e ben infossata all'interno del *core* catalitico (fig. 2.11) (Johnson, 2003).



Figura 2.11. Faccia distale del CYP2C5 in cui sono mostrate in arancione le SRS che formano di fronte al sesto sito di coordinazione dell'eme (in rosso) la cavità per il legame del substrato.

Le SRS sono delle regioni molto flessibili, sia per ciò che riguarda la sequenza che la loro collocazione spaziale, e tale caratteristica rende ragione dell'ampia specificità di substrato dei CYP, delle diverse cinetiche di reazione tra isoforme che riconoscono gli stessi substrati e

delle diverse regio- e stereoselettività con cui viene effettuata la reazione di ossidazione da parte di diversi CYP (Danielson, 2002).

La faccia prossimale (fig. 2.12), al contrario di quella distale, è strutturalmente più conservata in quanto è deputata all'interazione con la NADPH citocromo P450 reduttasi. A tale scopo, su questo versante dei CYP, il gruppo eme risulta essere più esposto.

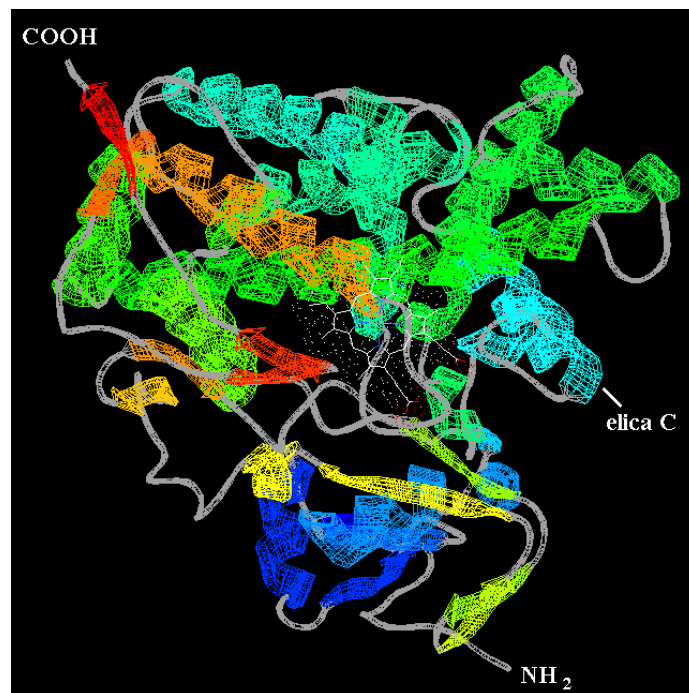


Figura 2.12. Faccia prossimale del CYP2C5 coinvolta nel legame della NADPH citocromo P450 reduttasi.

Nell'interazione fra i due *partners* redox gioca un ruolo fondamentale l' α elica C (fig. 2.12): quest'ultima infatti è carica positivamente (lisine e arginine) e interagisce elettrostaticamente (e idrofobicamente) con uno dei domini, quello di legame per l'FMN, della reduttasi carico invece negativamente (aspartato e glutammato) (fig. 2.13) (Scott e altri, 2004).

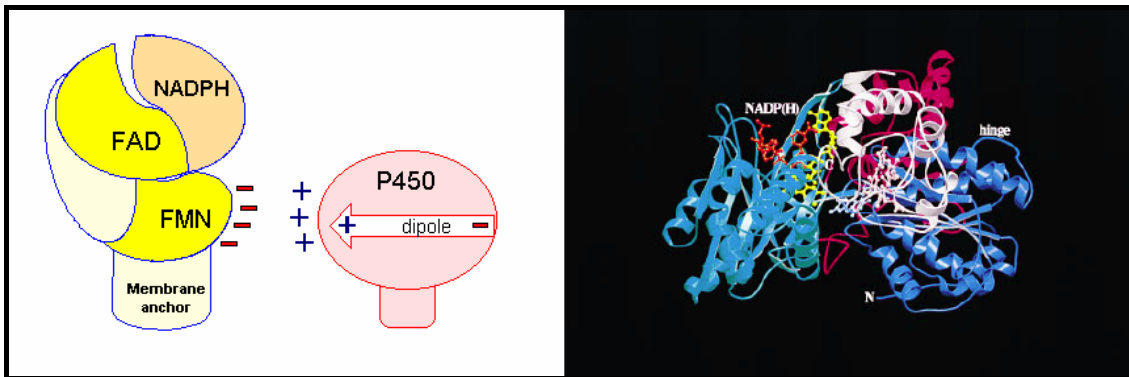


Figura 2.13. Interazione elettrostatica tra i CYP e la reduttasi. Sulla destra è mostrato un possibile modello di contatto tra le 2 proteine in cui il CYP (in bianco) lega frontalmente la reduttasi (in blu e fuxia).

Come si può notare dalla figura precedente (fig. 2.13), anche la reduttasi è dotata di due regioni principali: una porzione idrofobica N-terminale di 6 kDa che ancora la proteina alla matrice fosfolipidica del REL e partecipa alla corretta interazione con i CYP e il *core* catalitico C-terminale di 72 kDa che sporge nel citoplasma (fig. 2.8).

Quest'ultimo è costituito, dall'N- al C-terminale, da quattro domini principali:

- il dominio di legame per l'FMN;
- un dominio di connessione;
- il dominio di legame per il FAD;
- il dominio di legame per il NADPH (fig. 2.14).

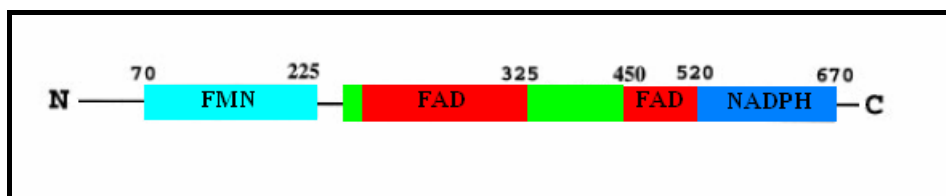


Figura 2.14. Diagramma dell'organizzazione dei quattro domini della NADPH citocromo P450 reduttasi. Il dominio di connessione è mostrato in verde e i numeri indicano la posizione dei diversi domini lungo la sequenza aminoacidica della proteina.

Il dominio FMN, come anticipato precedentemente, è il sito di interazione con le diverse isoforme di CYP e lega il cofattore flavinico all'estremità C-terminale della struttura α/β che lo costituisce. Il dominio FAD presenta invece un'organizzazione β e lega il cofattore flavinico in una conformazione estesa con la porzione isoallossazinica posizionata al confine tra i domini FAD e NADPH e il resto della molecola posto all'interfaccia tra il dominio FAD e di connessione (fig. 2.15). Tale conformazione fa sì che i due cofattori flavinici si trovino l'uno di fronte all'altro ed a una distanza tale da garantire il passaggio degli elettroni in modo diretto senza l'interazione di alcun residuo aminoacidico, ma piuttosto del dominio di connessione, una struttura α la cui funzione principale è quella di mantenere un corretto posizionamento del dominio FMN e FAD. Il dominio NADPH è situato sul lato opposto della regione di ancoraggio alla membrana ed è conformato in modo tale da consentire in modo agevole il transito del nucleotide piridinico da e verso il citoplasma (Wang e altri, 1997).

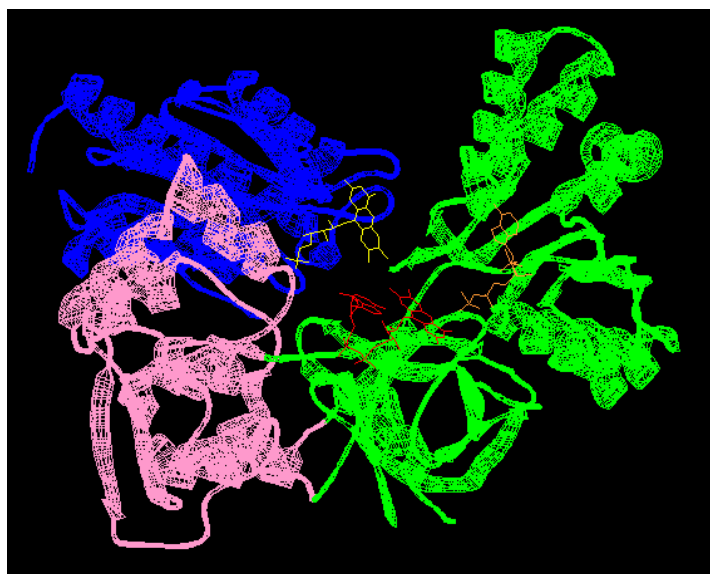
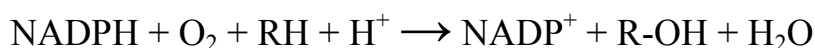


Figura 2.15. Organizzazione strutturale della NADPH citocromo P450 riduttasi. In blu è mostrato il dominio FMN, in rosa il dominio di connessione e in verde il dominio FAD e NADPH. L'FMN è mostrato in giallo, il FAD in rosso e il NADPH il arancione.

2.4.4 Biochimica e meccanismo d'azione del sistema monoossigenasico citocromo P450-dipendente

Le reazioni di ossidazione controllate dal sistema monoossigenasico citocromo P450-dipendente sono molteplici, ma possono riconoscere tutte alla loro base un processo di idrossilazione/monoossigenazione del substrato che richiede un agente riducente (NADPH) e ossigeno molecolare (O₂):



In una reazione tipica viene consumata una molecola di O₂ per ogni molecola di substrato: un atomo di ossigeno è incorporato in quest'ultimo mentre l'altro è ridotto ad acqua dai due equivalenti riducenti (2 H⁺ e 2 elettroni) condotti dal NADPH citosolico alle diverse isoforme di CYP attraverso l'unica forma di NADPH citocromo P450 reduttasi (fig. 2.16).

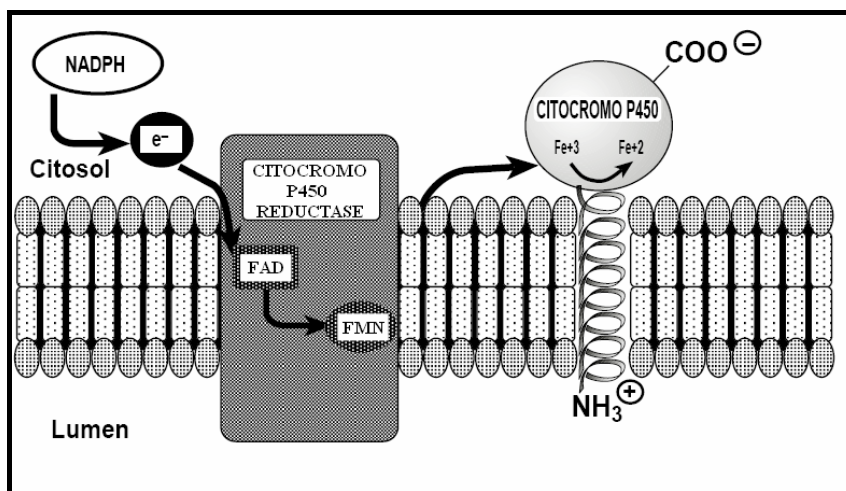


Figura 2.16. Catena di trasporto elettronico microsomiale.

In particolare (fig. 2.17), la catalisi enzimatica inizia con il legame del substrato nel sito attivo della forma ossidata del CYP (Fe³⁺), che, a riposo, lega una molecola d'acqua nel sesto sito di coordinazione (1). I

processi di desolvatazione e di legame del substrato sono accompagnati da un cambiamento conformazionale e da un aumento del potenziale redox del CYP che facilitano rispettivamente l'interazione con la reduttasi e il trasferimento elettronico. Il CYP viene quindi ridotto allo stato ferroso (Fe^{2+}) dal primo elettrone della coppia fornita dal NADPH attraverso la NADPH citocromo P450 reduttasi (2). Il complesso substrato-citocromo ridotto incorpora una molecola di ossigeno nel sesto sito di coordinazione dell'eme (3) formando il complesso $\text{Fe}^{2+} - \text{O}_2$ (3) in equilibrio con la specie $\text{Fe}^{3+} - \text{O}_2^-$ (4). A questo punto interviene il secondo elettrone messo a disposizione dal NADPH. Il risultato della seconda riduzione è la formazione del complesso $\text{Fe}^{2+} - \text{O}_2^-$ (5) in equilibrio con la forma $\text{Fe}^{3+} - \text{O}_2^{2-}$ (6). L'ossigeno di quest'ultima reagisce con 2 H^+ generando una molecola d'acqua e il complesso FeO^{3+} (7). L'ossigeno di quest'ultimo è altamente reattivo e sottrae al substrato un atomo di idrogeno generando il radicale $\text{R}\cdot$ (8). Il gruppo $-\text{OH}$ che si è formato nel *core* catalitico del CYP reagisce successivamente con il radicale $\text{R}\cdot$ che viene così idrossilato (9) e rilasciato a favore di una nuova molecola di acqua (10) (Lewis, 2003).

La NADPH citocromo P450 reduttasi coordina il trasporto dei due equivalenti riducenti attraverso i cofattori flavinici FAD e FMN che rappresentano rispettivamente il sito accettore e donatore dei due elettroni provenienti dal NADPH e diretti al ferro eminico: i due equivalenti riducenti vengono trasferiti uno per volta al centro catalitico del CYP grazie alla capacità della reduttasi di stabilizzare la forma semichinonica dei due cofattori flavinici (fig. 2.18) (Gutierrez e altri, 2003).

La capacità di intervenire su numerosissimi substrati rende il sistema monoossigenasico in grado di catalizzare svariati tipi di reazioni di ossidazione:

- **idrossilazione alifatica e aromatica:** è la più comune e meglio compresa reazione catalizzata dal sistema. L'idrossilazione

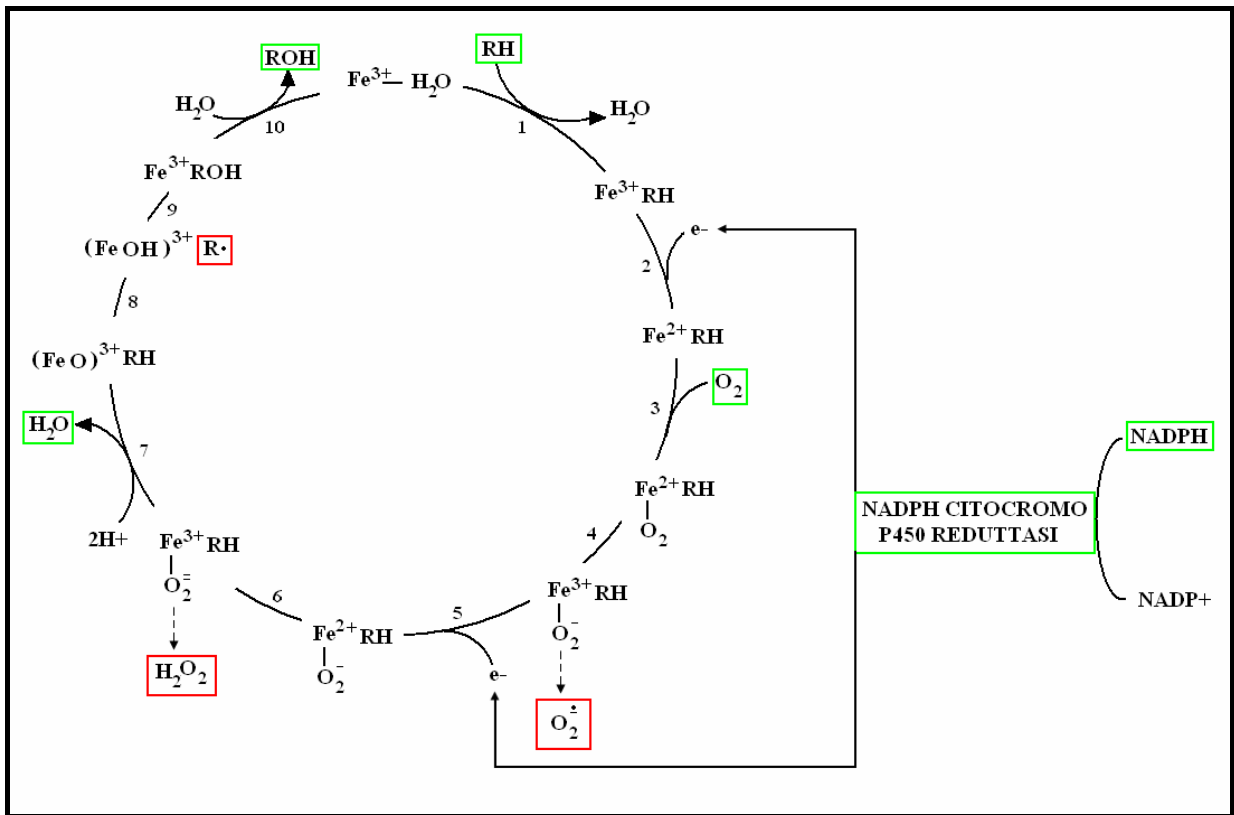


Figura 2.17. Ciclo catalitico del sistema monoossigenasico citocromo P450-dipendente. In rosso sono indicate le specie reattive dell'ossigeno (ROS) che possono essere rilasciate durante la reazione.

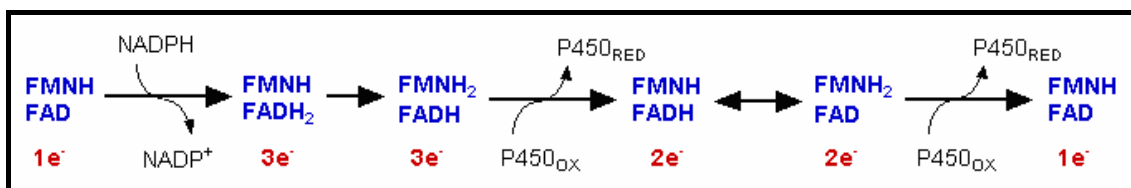


Figura 2.18. Ciclo redox della NADPH citocromo P450 reductasi.

alifatica consiste nell'inserzione su di un carbonio non aromatico di un ossidrilite a livello del legame C-H. Quella aromatica si verifica invece per aggiunta di ossigeno su un doppio legame del sistema aromatico con la formazione di un

eossido che si riarrangia spontaneamente a ossidrile. Conseguentemente all'idrossilazione si può verificare: a) una reazione di dealchilazione (rilascio di eteroatomi N, O e S) che risulta dall'idrossilazione di un atomo di carbonio adiacente all'eteroatomo e porta alla formazione di un intermedio instabile in cui si verifica la rottura del legame C-eteroatomo; b) una reazione di dealogenazione ossidativa che rappresenta la via di trasformazione dei composti alogenati lipofili. Il meccanismo della reazione prevede il legame di un ossigeno sul carbonio alogenato dopo sottrazione di un radicale idrogeno o di un elettrone all'alogeno: si ha la formazione di un intermedio X-C-OH che si decompone rilasciando un carbonile e l'alogeno sottoforma di XH;

- **ossigenazione di eteroatomi (N, S, P ed I):** consiste nel trasferimento di un ossigeno o di un ossidrile ad una coppia di elettroni liberi dell'eteroatomo. E' una reazione che risente fortemente dell'elettronegatività di quest'ultimo: una maggiore elettronegatività si traduce in una minor reattività dell'eteroatomo stesso;
- **eossidazione:** si tratta della conversione delle olefine nei rispettivi epossidi che si verifica come conseguenza dell'inserzione di un atomo di ossigeno ad un doppio legame tra due atomi di carbonio.

Unitamente alle summenzionate ossidazioni, il sistema monoossigenasico catalizza una serie di reazioni "inusuali" che comprendono:

- **riduzione:** si tratta di reazioni che si verificano in condizioni di carenza di ossigeno. Riguardano principalmente composti azo, nitro, aromatici e alogenati (che subiscono così dealogenazione). Il sistema monoossigenasico non riduce solo molecole organiche ma anche inorganiche come l' SO_2 e Cr^{VI} ;
- **desaturazione:** consiste nella rimozione di due atomi di idrogeno dal substrato con formazione di un doppio legame.

Dal punto di vista elettronico è equivalente a una reazione di idrossilazione in quanto consiste in un'ossidazione bielettronica;

- **scissione ossidativa di esteri:** consiste nell'introduzione di un ossigeno sul gruppo uscente con conseguente rilascio di un acido carbossilico e di un aldeide;
- **espansione e formazione di anelli:** si tratta di reazioni in cui il prodotto si riarrangia a formare sistemi penta- o esaciclici maggiormente stabili e si assiste alla generazione di anelli assenti prima della catalisi, rispettivamente;
- **deidratazione:** consiste nella sottrazione di una molecola di acqua al substrato, principalmente aldossime convertite a nitrili;
- **riarrangiamenti di idroperossidi di acidi grassi e prostaglandine:** come dice il nome stesso sono reazioni di riarrangiamento e di solito non coinvolgono l'intervento di fonti elettroniche esterne;
- **isomerizzazioni:** consistono nel cambiamento dall'orientazione cis alla trans e viceversa dei sostituenti di un substrato.

A queste bisogna aggiungere **ossidazioni monoelettroniche, la scissione di aldeidi ed un'attività di fosfolipasi D** (Guengerich, 2001).

Come è possibile notare (fig. 2.17), il ciclo catalitico alla base delle numerose reazioni di ossidazione catalizzate dal sistema monoossigenasico è una possibile fonte di stress ossidativo: può rilasciare infatti il radicale substrato ($R\cdot$) unitamente a ROS come l'anione superossido ($O_2^{\cdot-}$) e il perossido di idrogeno (H_2O_2) che a loro volta possono generare altri radicali (fig. 2.19) (Paolini e altri, 1996).

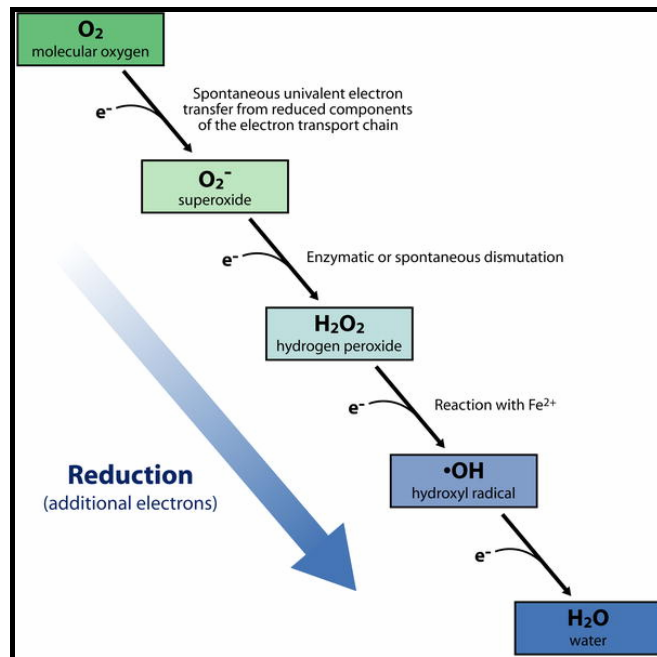


Figura 2.19. Specie reattive dell'ossigeno (ROS).

2.4.5 Le isoforme umane di CYP

Il genoma umano codifica per 57 CYP e 29 pseudogeni. Le corrispondenti proteine sono organizzate in 18 famiglie e 43 sottofamiglie (Tab. 2.2) e la maggior parte di esse partecipa al metabolismo endogeno mentre circa 15 sono deputate soprattutto al metabolismo degli xenobiotici (Guengerich, 2003).

- **Famiglie di CYP coinvolte nel metabolismo degli xenobiotici:**

Le principali isoforme coinvolte nel metabolismo degli xenobiotici appartengono alle famiglie CYP1, 2, 3 e 4. Ciascuna di queste è costituita da cluster di numerose sequenze altamente correlate fra di loro e spesso organizzate in tandem che codificano per enzimi con una specificità di substrato molto ampia e parzialmente sovrapponibile.

CYP Family	Primary Function(s)	Subfamilies	Genes	Pseudogenes
1	drug metabolism	3	3	1
2	drug / steroid metabolism	13	16	13
3	drug metabolism	1	4	2
4	Arachidonic acid / fatty acid metabolism	5	12	9
5	thromboxane synthase	1	1	0
7	steroid 7 α -hydroxylase	2	2	0
8	Bile acid biosynthesis; prostacyclin synthase	2	2	0
11	steroid biosynthesis	2	3	0
17	steroid biosynthesis (steroid 17 α -hydroxylase)	1	1	0
19	steroid biosynthesis (aromatase)	1	1	0
20	function not determined	1	1	0
21	steroid biosynthesis	1	1	1
24	vitamin D deactivation	1	1	0
26	retinoic acid hydroxylase	3	3	0
27	bile acid biosynthesis; vitamin D3 activation;	3	3	0
39	function not determined	1	1	0
46	cholesterol 24-hydroxylase	1	1	0
51	lanosterol 14 α -demethylase	1	1	3

Tabella 2.2. Le isoforme umane di CYP e le loro relative funzioni.

Famiglia CYP1

Consiste di tre membri CYP1A1, CYP1A2 e CYP1B1. Le isoforme CYP1A1 e CYP1A2 presentano un'identità di sequenza del 70% ma un diverso *pattern* tissutale di espressione. Il CYP1A1 è espresso principalmente in tessuti extraepatici come i polmoni, i linfociti e la placenta. Al contrario il CYP1A2 è espresso principalmente nel fegato. Queste due isoforme sono responsabili del metabolismo di numerosi xenobiotici come gli idrocarburi aromatici policiclici tra i quali il benzo[a]pirene e le diossine. Catalizzano la N-ossidazione di ammine aromatiche ed eterocicliche fortemente cancerogene presenti nel fumo di sigaretta e nei cibi molto cotti.

Oltre a bioattivare numerosi cancerogeni, il CYP1A2 metabolizza diversi farmaci tra cui antipirina, acetaminofene, mexiletina, fenacetina, teofillina, naproxene e il warfarin per citarne alcuni. E' inoltre coinvolto nel metabolismo dell'eme e degli estrogeni.

L'isoforma CYP1B1 è costitutivamente espressa a bassi livelli in una grandissima varietà di tessuti tra i quali il cervello, il cuore, il colon, i polmoni, i reni, i leucociti, il fegato, ecc.. . Anche tale isoforma è coinvolta nella bioattivazione di molecole cancerogene.

Famiglia CYP2

E' la più ampia famiglia umana di citocromi: comprende infatti 13 sottofamiglie con un totale di 16 sequenze funzionali (CYP2A6, CYP2A7, CYP2A13, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP2F1, CYP2J2, CYP2R1, CYP2S1, CYP2U1, CYP2W1) e 13 pseudogeni. I membri di tale famiglia giocano un ruolo molto importante nel metabolismo degli xenobiotici anche se solo il CYP2A6 è espresso a livelli significativi nel fegato; gli altri membri sono espressi in modo sesso-specifico. In particolare sono espressi nella mucosa olfattiva fetale probabilmente a protezione di un sito possibile bersaglio di agenti chimici nelle prime fasi di sviluppo.

Il CYP2A6 ossida numerosi composti di rilevanza clinica, come farmaci, e tossicologica come precancerogeni quali l'aflatossina B₁ e componenti del fumo di sigaretta. E' inoltre responsabile dell'idrossilazione in posizione 7 della cumarina e dell'attività C-ossidativa nei confronti della nicotina. Il CYP2A7 e il CYP2A13, i membri della famiglia CYP2A scoperti più recentemente, sono invece ancora poco caratterizzati, ma anch'essi sembrano partecipare alla bioattivazione di composti precancerogeni.

Il CYP2B6 è coinvolto nel metabolismo di farmaci come le benzfetamine, la cinnarizina, il bupropione, la ciclofosfamida, la lidocaina, la selegilina e molecole e composti inquinanti e di abuso come la nicotina.

Le proteine della sottofamiglia CYP2C codificano per proteine che presentano un'omologia di sequenza dell'80% e rappresentano il 20% del contenuto totale di citocromo epatico. Da un punto di vista clinico, maggiormente rilevanti sono i CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19. Il

primo è coinvolto nel metabolismo del taxolo, dell'acido retinoico, del retinale e dell'acido arachidonico. Il secondo rappresenta l'isoforma maggiormente espressa fra i membri della sottofamiglia 2C e presenta attività catalitica verso il warfarin, la tolbutamide, la fenitoina, i barbiturici, l'ibuprofene, il diclofenac e altri FANS. L'isoforma CYP2C19 è principalmente responsabile del metabolismo della mefenitoina e degli inibitori delle pompe protoniche come l'omeprazolo, benzodiazepine, antidepressivi e antimalarici come il proguanil.

Il CYP2D6 costituisce circa il 2% del citocromo totale epatico ed è espresso anche nel duodeno e nel cervello. Supporta il metabolismo ossidativo di più di 70 differenti farmaci appartenenti alle classi dei β -bloccanti, antiaritmici, antipsicotici, antidepressivi e analgesici narcotici.

Il CYP2E1 è espresso nel fegato (dove costituisce il 7% circa del contenuto totale di citocromo), nei polmoni e nel cervello. I suoi substrati sono principalmente molecole piccole di natura idrofobica che vengono bioattivate a cancerogeni. In particolare è implicato nel metabolismo delle N-nitrosammine presenti nel fumo di sigaretta e associate a forme tumorali nasofaringee, del paracetamolo, dell'acetaminofene, del benzene e di anestetici generali come l'alotano. Tale isoforma è inoltre coinvolta nel metabolismo dell'etanolo anche se in maniera marginale rispetto al principale sistema di eliminazione degli alcoli rappresentato dalle alcol e aldeide deidrogenasi.

L'isoforma CYP2F1 non è espressa a livello epatico e il suo mRNA, ma non la proteina, è presente a livello dei polmoni e della placenta. Presenta attività catalitica verso il 3-metil-indolo e il naftalene e ha capacità O-dealchilante verso la 7-etossicumarina, la 7-propossicumarina, la 7-pentossiresorufina e la 7-benzilossiresorufina. I geni dei due membri della sottofamiglia CYP2G (CYP2G1 e 2) contengono mutazioni per perdita di funzione nell'86-94% degli

uomini, alleli funzionali sembrano siano presenti solo in popolazioni africane e ispaniche.

L'isoforma CYP2J2 è principalmente extraepatica ed è espressa nel tratto gastrointestinale, nel cuore, nei reni, nei polmoni e nel pancreas. E' coinvolta nel metabolismo dell'acido arachidonico ma anche in quello dei farmaci: è infatti la principale idrossilasi intestinale dell'antistaminico ebastina.

Gli enzimi CYP2R1, CYP2S1, CYP2U1, CYP2W1 sono stati annoverati solo di recente all'interno della famiglia CYP2 e, conseguentemente, le loro capacità catalitiche e metaboliche sono pressoché sconosciute.

Famiglia CYP3

Consiste di una singola sottofamiglia composta da quattro membri funzionali (CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, CYP3A43) e 2 pseudogeni. Le proteine codificate dai geni CYP3A presentano una sovrapponibile specificità di substrato, ma diversa espressione tissutale.

Il CYP3A4 è espresso quasi esclusivamente nel fegato: si tratta dell'isoforma intestinale ed epatica più abbondante (costituisce circa il 30% del contenuto totale di citocromo del fegato) (fig. 2.20A) e maggiormente coinvolta nel metabolismo ossidativo degli xenobiotici (fig. 2.20B).

Riconosce un'ampia varietà di substrati: è in grado di metabolizzare infatti circa 120 diversi xenobiotici ed è implicato nel metabolismo del 60% dei farmaci attualmente in circolazione. Alcuni dei più importanti substrati verso i quali l'isoforma mostra attività catalitica sono: antibiotici macrolidi come l'eritromicina, antiaritmici come la quinidina, benzodiazepine tra cui diazepam e midazolam, modulatori del sistema immunitario come le ciclosporine, agenti antivirali, agenti procinetici, antistaminici come la terfenidina, bloccanti dei canali del calcio, inibitori della HMG CoA reduttasi, analgesici oppioidi, caffeina e ipnotici non benzodiazepinici come lo zolpidem.

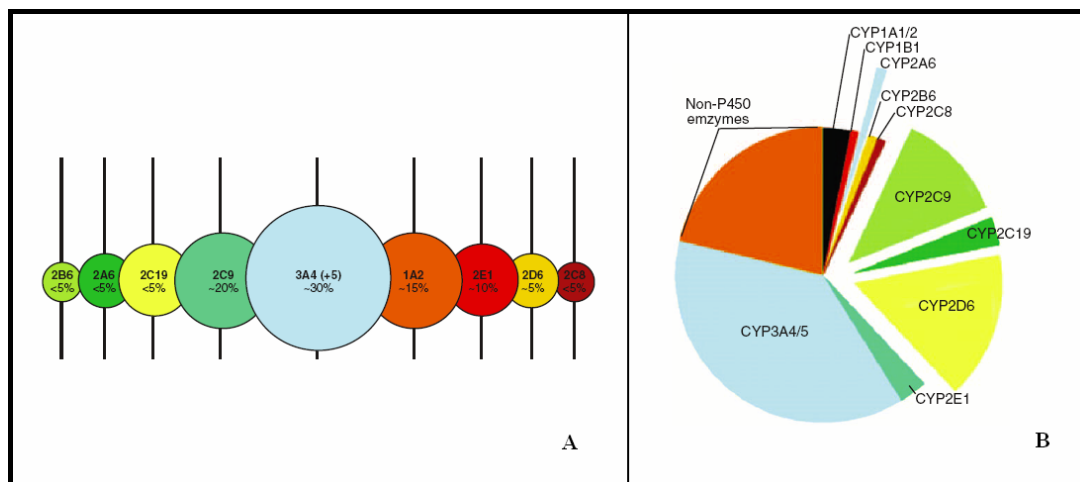


Figura 2.20. Composizione del contenuto totale di citocromo epatico (A) e contributo delle diverse isoforme al metabolismo ossidativo degli xenobiotici (B).

E' coinvolta inoltre nella bioattivazione di numerosi procancerogeni tra cui l'aflatossina B₁, gli idrocarburi aromatici policiclici e la nitrosammina NNK contenuta nel fumo di sigaretta. Oltre al coinvolgimento nel metabolismo degli xenobiotici, partecipa anche a quello endogeno steroideo (progesterone, testosterone, androstenedione).

Il CYP3A5 è principalmente un'isoforma extraepatica ed è espressa nei polmoni, nel colon, nei reni, nell'esofago e nell'ipofisi anteriore. Ha molti substrati in comune con l'isoforma CYP3A4 anche se li metabolizza con un turnover più lento.

L'isoforma CYP3A7 è una forma epatica fetale, la sua espressione è pressoché assente nel tessuto adulto. E' coinvolta nell'idrossilazione del testosterone in posizione 6 α .

Il membro più recente di tale famiglia è l'isoforma CYP3A43. Il suo mRNA è abbondantemente espresso nel fegato, nei testicoli e nella prostata dove probabilmente partecipa al metabolismo degli ormoni steroidei.

Famiglia CYP4

Consiste di cinque sottofamiglie per un totale di 12 sequenze funzionali (CYP4A11, CYP4A20, CYP4A22, CYP4B1, CYP4F2, CYP4F3, CYP4F8, CYP4F11, CYP4F12, CYP4F22, CYP4V2 e CYP4X1) e 9 pseudogeni.

I membri della sottofamiglia CYP4A sono espressi principalmente nei reni e in minor misura nel fegato. La loro attività catalitica è rivolta principalmente verso gli acidi grassi a media e lunga catena e alle prostaglandine, mentre del tutto trascurabile è la partecipazione al metabolismo degli xenobiotici.

L'isoforma CYP4B1 è uno dei pochi membri della famiglia CYP4 che partecipa al metabolismo esogeno. E' espressa nei polmoni, nel colon, nella prostata, nella placenta e nella vescica dove la sua capacità di partecipare alla bioattivazione del 6-amminofluorene sembra essere correlata a numerose forme tumorali.

Il CYP4F3 è espresso nelle cellule mieloidi del sangue periferico, nel midollo osseo, nella trachea e nel tratto gastrointestinale. Partecipa solo al metabolismo endogeno.

L'isoforma CYP4F8 è espressa nelle vesciche seminali dove partecipa al metabolismo dell'acido arachidonico e all' ω -2- e ω -3-idrossilazione delle prostaglandine.

Il gene CYP4F11 è espresso nel fegato, nei reni, nel cuore e nella muscolatura scheletrica dove codifica per enzimi coinvolti nell'idrossilazione degli eicosanoidi.

Il CYP4F12 presenta un *pattern* di espressione tissutale del tutto sovrapponibile a quello dell'isoforma CYP4F12 e, come quest'ultima, partecipa al metabolismo degli eicosanoidi e all'idrossilazione dell'antistaminico ebastina, seppure in modo marginale rispetto all'isoforma CYP2J2.

Poco è riportato in letteratura sui CYP4F22, CYP4V2 e CYP4X1 (Danielson, 2003).

- **Famiglie di CYP coinvolte nel metabolismo endogeno:**

Le rimanenti 14 famiglie di CYP sono principalmente coinvolte nel metabolismo endogeno. Al contrario di quelle summenzionate, sono composte da pochi membri funzionali con una più ristretta specificità di substrato. La catalisi è votata principalmente al mantenimento dei livelli di metaboliti di natura non proteica (derivanti da substrati come il colesterolo, gli acidi biliari, gli ormoni steroidei, gli acidi grassi, le prostaglandine e altri eicosanoidi, le vitamine) coinvolti, attraverso diversi *pathway* di segnalazione, nella crescita, nel differenziamento, nell'apoptosi, nell'omeostasi e in funzioni neuroendocrine (Nebert, 1994).

Famiglia CYP5

Consiste di un solo membro, il CYP5A1. Tale isoforma codifica per la trombassano A₂ sintasi che converte la prostaglandina H₂ in un mix 1:1:1 di malonildialdeide, acido idrossieptatrienoico e trombassano A₂. Quest'ultimo è un acido grasso a 20 atomi di carbonio coinvolto nella via di segnalazione dell'acido arachidonico che stimola la vasocostrizione e l'aggregazione piastrinica.

Famiglia CYP7

E' formata da due membri funzionali, il CYP7A1 e il CYP7B1.

L'isoforma CYP7A1 è coinvolta nell'omeostasi epatocellulare del colesterolo: codifica infatti per la colesterolo 7 α -idrossilasi che catalizza il primo passo della via classica di biosintesi degli acidi biliari.

Il CYP7B1 è espresso in numerosi organi e tessuti periferici dove codifica per la 7 α -ossisterolo-idrossilasi che catalizza l'idrossilazione degli ossisteroli e neurosteroli a 7 α -idrossi-DHEA e 7 α -idrossi-pregnenolone.

Famiglia CYP8

Anche questa famiglia è composta da due isoforme: il CYP8A1 e il CYP8B1.

Il CYP8A1 codifica per la prostaciclina sintasi che converte la prostaglandina H₂ in prostaciclina (prostaglandina I₂). Anche quest'ultima è un acido grasso a 20 atomi di carbonio coinvolto nella via di segnalazione dell'acido arachidonico che stimola la vasodilatazione e contrasta l'aggregazione piastrinica. Tale isoforma quindi, insieme al CYP5A1, è responsabile dell'omeostasi del sistema cardiovascolare.

L'isoforma CYP8B1 è espressa a livello epatico dove codifica per una 12 α -idrossilasi importante nella via di biosintesi degli acidi biliari.

Famiglia CYP11

La famiglia CYP11 è composta da 3 sequenze funzionali codificanti per il CYP11A1, CYP11B1, CYP11B2. Tutti e tre i geni codificano per CYP localizzati nella membrana interna dei mitocondri dove partecipano alla biosintesi degli steroidi. Sono espressi soprattutto nei tessuti endocrini come le ghiandole surrenali.

In particolare, il CYP11A1 è espresso, sebbene in maniera trascurabile rispetto alle surrenali, anche nel cervello in modo dipendente dall'età e dal sesso. Tale isoforma è coinvolta nella sintesi degli ormoni steroidei in quanto catalizza il taglio della catena laterale che converte il colesterolo in pregnenolone.

L'isoforma CYP11B1 è espressa in corrispondenza della zona fascicolata e reticolare della corteccia surrenale dove codifica per la 11 α -idrossilasi che converte l'11-deossicortisolo e l'11-deossicorticosterone nel glucocorticoide cortisolo e nel mineralcorticoide corticosterone, rispettivamente.

Il CYP11B2 è invece espresso nella zona glomerulare della corteccia surrenale dove partecipa alla tappa finale di sintesi del mineralcorticoide aldosterone.

Famiglia CYP17

Contiene l'unica isoforma CYP17A1 espressa nelle ghiandole surrenali e nelle gonadi. Si tratta di un enzima bifunzionale che ha attività di 17 α -idrossilasi e di 17-20 liasi necessarie per convertire il pregnenolone in deidroepiandrosterone, precursore a 19 atomi di carbonio degli androgeni ed estrogeni.

Famiglia CYP19

Anche questa famiglia contiene un unico membro, il CYP19A1, espresso nelle gonadi, nel cervello, nel tessuto adiposo, nella pelle, nella placenta e nel seno.

Catalizza per l'aromatasi che converte gli androgeni in estrogeni attraverso la perdita del gruppo metilico angolare C-19 e la formazione dell'anello A aromatico.

Famiglia CYP20

Consiste di un unico membro, il CYP20A1, da poco annoverato nella superfamiglia dei CYP. Sembra essere un'isoforma specifica dei vertebrati alla quale, però, non è stata ancora ricondotta alcuna funzione.

Famiglia CYP21

La famiglia CYP21 è caratterizzata da un singolo gene espresso principalmente nelle ghiandole surrenali. Questo enzima codifica per l'idrossilasi che converte il progesterone e il 17-idrossiprogestosterone rispettivamente in 11-deossicorticosterone e 11-deossicortisolo, metaboliti necessari per la sintesi di corticosterone, aldosterone e del cortisolo.

Famiglia CYP24

E' composta da un'unica isoforma mitocondriale, il CYP24A1, che è espressa principalmente nei reni. E' coinvolta nel metabolismo della

vitamina D₃: codifica infatti per una 24-(25-idrossi-vitamina D₃)-idrossilasi. Attraverso questa attività è responsabile dell'inattivazione di due metaboliti della vitamina D₃: la 25-idrossi vitamina D₃ e la 1 α , 25-diidrossi vitamina D₃.

Famiglia CYP26

Questa famiglia consiste di tre geni funzionali: CYP26A1, CYP26B1 e CYP26C1.

Il CYP25A1 è espresso nel fegato, nel cuore, nell'ipofisi, nelle ghiandole surrenali, nella placenta e in diverse regioni cerebrali. E' un'idrossilasi specifica dell'acido retinoico in forma trans del quale media la degradazione.

Le isoforme CYP26B1 e CYP26C1 sono state annoverate solo di recente all'interno di questa famiglia. Anch'esse sembrano essere coinvolte nel metabolismo dell'acido retinoico.

Famiglia CYP27

Appartengono a questa famiglia i citocromi mitocondriali CYP27A1, CYP27B1, CYP27C1.

L'isoforma CYP27A1 è espressa nel tessuto epatico fetale ed adulto e nei reni. E' coinvolta nella generazione di 8 diversi metaboliti attivi della vitamina D₃, in particolare della 25-idrossi vitamina D₃. Inoltre ha anche attività di 27-sterolo idrossilasi che catalizza l'ossidazione delle catene laterali degli intermedi metabolici nella via di biosintesi degli acidi biliari.

Il CYP27B1 è espresso in una grande varietà di tessuti tra i quali la pelle, i linfonodi, il colon, il pancreas, il cervello, la placenta e nei reni. In quest'ultimo sito catalizza la biosintesi dell'intermedio attivo 1 α , 25-diidrossivitaminina D₃ dal metabolita 25-idrossivitaminina D₃.

Il CYP27C1 è stato individuato solo di recente e le sue funzioni sono poco conosciute.

Famiglia CYP39

Anche in questo caso è presente un'unica isoforma, il CYP39A1. E' un enzima epatico che ha attività di 7α -ossisterolo-idrossilasi, preferenzialmente verso il 24-idrossicolesterolo, necessaria per la biosintesi dei 7α -idrossi-acidi biliari.

Famiglia CYP46

L'unica isoforma della famiglia, il CYP46A1, è espressa in diverse regioni cerebrali dove partecipa all'omeostasi del colesterolo. Quest'enzima infatti codifica per la 24-idrossilasi che metabolizza il colesterolo nel metabolita più facilmente eliminabile 24S-idrossicolesterolo.

Famiglia CYP51

Questa famiglia consiste di un gene funzionale (CYP51A1) e 2 pseudogeni. E' composta da sequenze che, contrariamente a quelle della maggior parte dei CYP, presentano un elevato grado di conservazione in tutti gli organismi in cui sono presenti.

Il CYP51A1 è espresso in modo ubiquitario, ma in maggior misura si trova nei testicoli e nelle ovaie. Codifica per la 14α -lanosterolo demetilasi, un enzima chiave nella via di biosintesi del colesterolo che rimuove il gruppo metilico C32 dal diidrolanosterolo (Danielson, 2003).

2.5 Le flavin-monoossigenasi o FMO

Le FMO, come il sistema monoossigenasico citocromo P450-dipendente, è associato al reticolo endoplasmico e catalizza la monoossigenazione di composti organici contenenti principalmente eteroatomi (azoto e zolfo) impiegando il FAD come cofattore flavinico e sfruttando ossigeno molecolare e NADPH come fonte di elettroni per la riduzione di uno degli atomi di ossigeno. La reazione

generale catalizzata da questo enzima è quindi del tutto paragonabile a quella mostrata precedentemente per il sistema monoossigenasico citocromo P450-dipendente.

Differiscono però in alcuni aspetti, fra i quali il meccanismo di catalisi. Le FMO, infatti, reagiscono con ossigeno molecolare e NADPH in assenza di substrato per generare un intermedio enzimatico elettrofilo, il 4 α idroperossido, che racchiude tutta l'energia necessaria per la catalisi. Ciò significa che l'enzima esiste nelle cellule in forma attivata e che tutto ciò che è richiesto per il completamento della reazione è l'interazione con un gruppo nucleofilo (ammine, tioli e fosfati) del substrato (fig. 2.21).

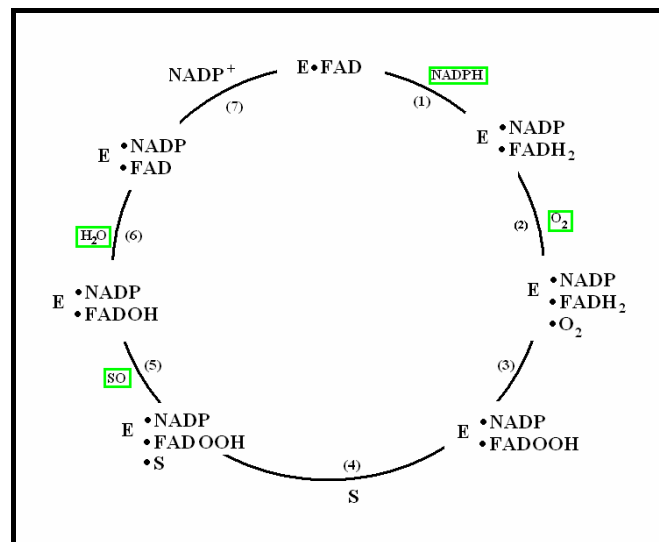


Figura 2.21. Ciclo catalitico delle FMO (E = enzima; S = substrato; SO = substrato monoossigenato).

Inoltre, a differenza del sistema monoossigenasico citocromo P450-dipendente, non è un sistema multienzimatico: gli elettroni, quindi, giungono direttamente dal NADPH all'enzima. Infine, tale sistema non sembra essere inducibile (caratteristica saliente del sistema precedentemente trattato): fino ad oggi, infatti, non sono noti induttori per queste monoossigenasi (Rettie e altri, 1999).

2.6 Enzimi di fase II

Gli xenobiotici e i loro metaboliti di fase I che contengono adatti gruppi funzionali prendono spesso parte a reazione di coniugazione con sostanze endogene. Queste ultime traggono origine principalmente dagli alimenti e comprendono acido glucuronico, glutatione, aminoacidi, gruppi metilici, gruppi acetili, ecc.. In generale, i coniugati sono molecole polari facilmente escrete e spesso inattive. La loro formazione richiede la presenza di un coenzima che fornisca la molecola coniugante al substrato e di enzimi specifici, le transferasi, che catalizzano il legame della molecola coniugante allo xenobiotico o a un suo metabolita. Per gli enzimi di fase II valgono le medesime considerazioni fatte per quelli di fasi I: a) sono infatti anch'essi organizzati in famiglie e sottofamiglie e le diverse isoforme, che riconoscono xenobiotici e sostanze endogene, vengono indicate con il medesimo sistema di nomenclatura adottato per i CYP (Hinson e altri, 1995); b) sebbene da un punto di vista "istituzionale" il loro compito sia quello di rendere ancora più solubili le molecole rispetto alla forma già modificata dalla fase I, anch'essi sono in grado di bioattivare una grande varietà di composti e molecole tossiche, mutagene e cancerogene (Paolini e Legator, 1992; Paolini e Nestle, 2003).

Le principali reazioni di fase II sono:

- **Glucuronoconiugazione:** si tratta della reazione di coniugazione più comune e maggiormente coinvolta nel metabolismo degli xenobiotici, dopo il CYP (fig. 2.4). E' caratterizzata dalla formazione di un legame glicosidico fra un gruppo nucleofilo del substrato (-OH, -COOH, -NH₂, -NH, -SH, -CH) e il carbonio 1 dell'anello piranosidico dell'acido glucuronico (la forma acida del glucosio) con formazione di un β-D-glucuronide e rilascio di UDP (fig. 2.22A). L'acido glucuronico è trasportato dal coenzima attivato acido uridindifosfoglucuronico (UDPGA) (fig. 2.22B).

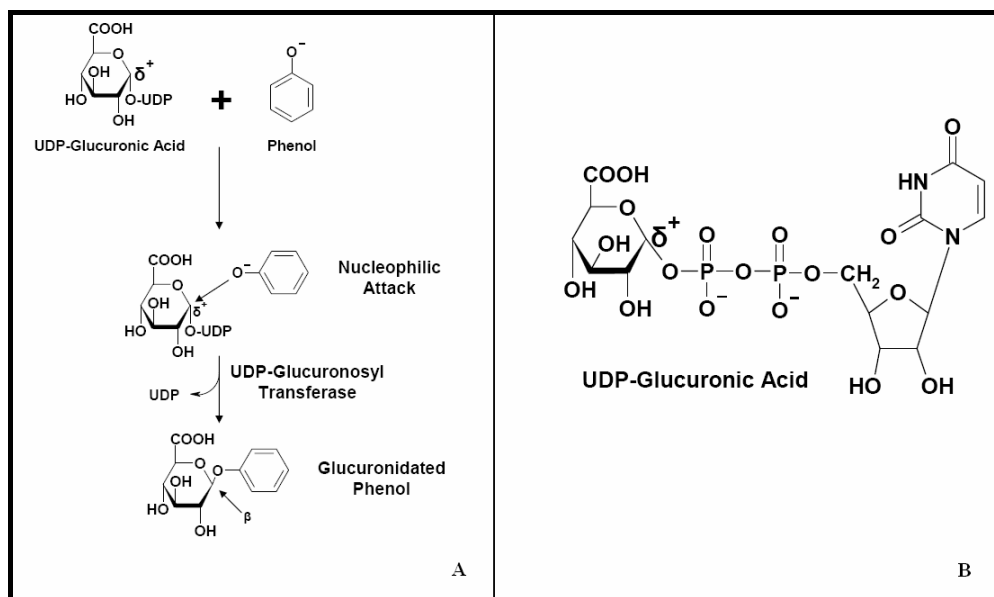


Figura 2.22. La reazione di glucuroconiugazione (A) e l'acido uridindifosfoglucuronico (UDPGA), coenzima della reazione (B).

La reazione è catalizzata dalla superfamiglia delle UDPG-glucuroniltransferasi (UDPGT o UGT). Si tratta di proteine integrali di membrana di 50-60 kDa che vengono sintetizzate come precursori di 530 aminoacidi dotati di una sequenza N-terminale che indirizza la proteina alla membrana del REL (o a quella nucleare). L'enzima maturo è costituito da due catene polipeptidiche di circa 505 aminoacidi ciascuna e presenta due domini funzionali:

- il dominio C-terminale: ancora l'enzima alla membrana e presenta una sequenza molto conservata. Ciò suggerisce che sia coinvolto nel legame dell'UDPGA;
- il dominio N-terminale: è immerso nello spessore della membrana del REL (o di quella nucleare) e presenta un'elevata variabilità di sequenza. Tale regione è infatti deputata al legame della grande varietà di agliconi esogeni ed endogeni (Radomska-Pandya e altri, 1999).

Praticamente tutte le isoforme di UGT sono presenti in grandi quantità nel fegato (fatta eccezione per le UGT1A5, UGT1A7, UGT1A8, UGT1A10) e in misura minore nei reni, nello stomaco, nel colon, nel sistema nervoso centrale, nei polmoni, nei testicoli, nella prostata e nella pelle. Sono raggruppate in due famiglie, UGT1 e 2, ciascuna delle quali presenta rispettivamente la sola sottofamiglia UGT1A e le sottofamiglie UGT2A, UGT2B e UGT2C.

Gli enzimi della sottofamiglia UGT1A sono codificati da un unico gene posto sul cromosoma 2 e dotato di una struttura molto complessa: è infatti costituito da un esone 1 molto lungo e dotato di più siti promotoriali che va incontro a *splicing* alternativo per essere unito agli esoni 2, 3, 4, 5 (comuni a tutte le UGT) e generare le differenti isoforme della sottofamiglia UGT1A. Questa sottofamiglia è principalmente deputata al metabolismo degli xenobiotici e in particolare di metaboliti del benzo[a]pirene, acetilaminofluorene, fenoli planari e ramificati, flavonoidi, alcol alifatici, ammine e antrachinoni e di numerosi farmaci tra i quali acetaminofene, naproxene, ibuprofene, fenolftaleina, umbelliferone, morfina e altri oppioidi, acido valproico. Partecipa anche al metabolismo endogeno che riguarda principalmente la bilirubina e l'acido retinoico tutto-trans (UGT1A1), un gran numero di ormoni steroidei, alcuni neurotrasmettitori come la serotonina (UGT1A6).

I geni della famiglia UGT2 sono invece codificati da geni individuali. Nell'ambito della famiglia UGT2 è stata maggiore oggetto di studio la più numerosa sottofamiglia UGT2B i cui geni sono raggruppati sul cromosoma 4. Le isoforme di UGT di quest'ultima sono principalmente coinvolte nel metabolismo endogeno: i substrati riconosciuti sono principalmente molecole di natura steroidea (acidi ed ormoni), acidi biliari, acidi grassi e angiotensina II. Tra gli xenobiotici vengono metabolizzati soprattutto morfina e altri oppioidi, antinfiammatori non steroidei, l'AZT impiegato nel trattamento dell'HIV, fenoli, alcol alifatici e derivati del benzo[a]pirene e dell'acetilaminofluorene (King e altri, 2000).

- **Coniugazione con glutatione:** è caratterizzata dalla formazione di un legame tioetere fra il glutatione ridotto, il tripeptide γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina (fig. 2.23A) e substrati elettrofilo potenzialmente tossici come gli epossidi (fig. 2.23B).

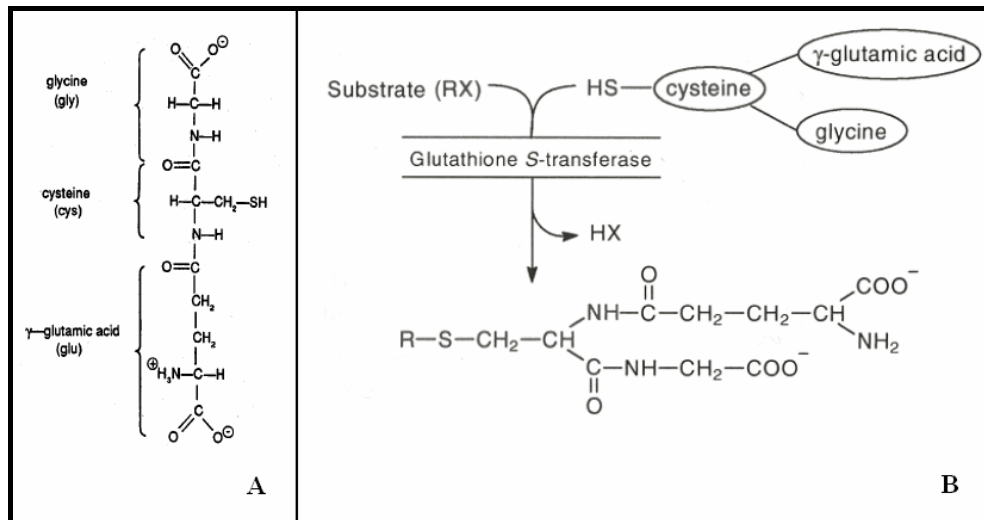


Figura 2.23. Il glutatione ridotto (A) e la reazione di coniugazione (B).

La reazione è catalizzata dalla superfamiglia delle glutatione S-transferasi (GST). Quest'ultima comprende due gruppi principali di enzimi: le GST microsomiali, coinvolte nel metabolismo del glutatione e degli eicosanoidi e le GST citosoliche, implicate nel metabolismo degli xenobiotici e quindi trattate di seguito.

Si tratta di proteine pressoché ubiquitarie che possono costituire anche il 3-10% delle proteine solubili nel citosol epatico. Sono proteine a carattere omodimerico costituite da subunità di 25 kDa che presentano due domini principali:

- un dominio N-terminale ad α -elica molto conservato che lega il glutatione:
- un dominio C-terminale, anche esso ad α -elica, molto variabile che lega il substrato.

Vengono classificate in quattro classi principali, Alpha (α), Mu (μ), Pi (π), Theta (θ), alle quali si sono recentemente aggiunte le classi Kappa (κ), Omega (ω), Sigma (δ) e Zeta (ζ). Anche nel caso delle GST i substrati riconosciuti sono sia endogeni (ormoni steroidei, acidi biliari, bilirubina) ed esogeni tra cui idrocarburi aromatici policiclici, ammine aromatiche e farmaci come la tetraciclina, il cloramfenicolo e i nitrofurani.

Ad ogni modo si tratta di enzimi multifunzionali non solo coinvolti nel sistema della detossificazione, ma dotati anche di numerose altre attività tra le quali quella isomerasica delle classi α , μ e ζ nei confronti rispettivamente dell'androstenedione, dell'acido retinoico e dell'acido maleilacetoacetico, quella di prostaglandina D₂ sintasi della classe δ , di tiolo transferasi glutatione-dipendente della classe ω . Inoltre sono coinvolte nell'eliminazione delle specie reattive dell'ossigeno (Sheehan e altri, 2001).

- **Solfatazione:** in questa reazione il gruppo SO_3^- , donato dal coenzima attivato 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosolfato (PAPS) (fig. 2.24A), viene coniugato a gruppi nucleofili (-OH, -NH₂, -NHOH, -SH) dei substrati con rilascio di PAP (fig. 2.24B).

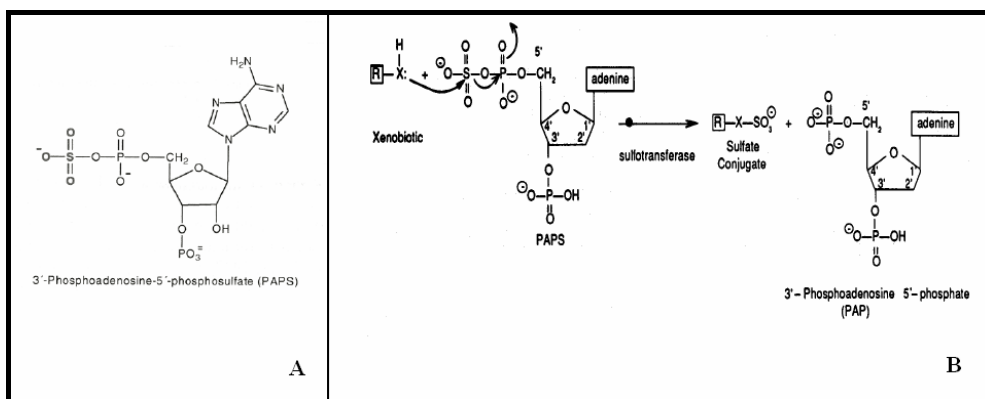


Figura 2.24. Il PAPS (A), coenzima donatore della reazione di solfatazione (B).

La reazione è catalizzata dalla superfamiglia delle solfotransferasi (SULT). Esistono due gruppi di solfotransferasi: enzimi di membrana, localizzati principalmente nell'apparato del Golgi dove catalizzano la solfatazione di glicosaminoglicani e di residui di tirosina di glicoproteine ed enzimi citosolici, coinvolti nel metabolismo endogeno e degli xenobiotici e quindi trattati di seguito.

Nell'uomo la superfamiglia delle SULT citosoliche comprende 10 geni suddivisi in 3 famiglie (SULT1A1, 2 3; SULT1B1; SULT1C1, 2; SULT1E1; SULT2A1; SULT2B1; SULT4A1) che codificano per proteine omo- ed eterodimeriche con un *pattern* di espressione tissutale specifico per ciascuna isoforma, anche se il fegato, il tratto gastrointestinale e i reni mostrano l'attività più alta. (Glatt e altri, 2001). Attualmente tali enzimi sono suddivisi in 3 categorie: le fenolo-SULT (SULT1A1, 2 3; SULT1B1; SULT1C1, 2) che metabolizzano composti endogeni (catecolammine) e xenobiotici (acetaminofene, salicilammide, naftolo) di natura fenolica; le estrogeno-SULT (SULT1E1) e le idrossisteroide-SULT (SULT2A1; SULT2B1) che metabolizzano ormoni e acidi biliari e xenobiotici (Weinshilboum e altri, 1997).

- **Metilazione:** è la reazione di fase II in cui un gruppo metilico (-CH₃) fornito dal donatore attivato S-adenosilmetionina (SAM) (fig. 2.25A) viene trasferito a metalli (mercurio, arsenico e selenio) e ai gruppi nucleofili -OH di fenoli e catecoli, -NH₂ di composti alifatici, aromatici ed eterociclici, -SH dei substrati endogeni ed esogeni con rilascio di S-adenosilomocisteina (fig. 2.25B).

La reazione è catalizzata dalle metiltransferasi che riconoscono una grande varietà di substrati, principalmente endogeni. Tali enzimi possono essere suddivisi in tre gruppi:

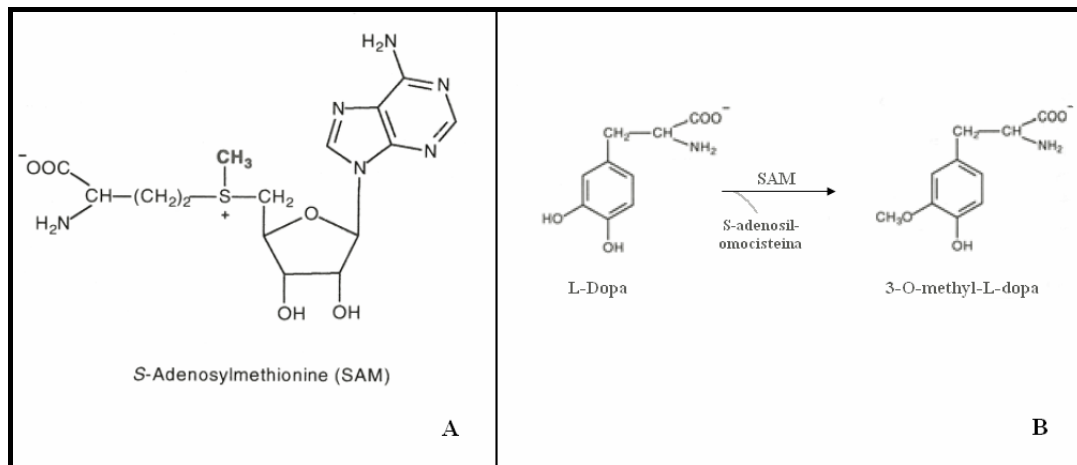


Figura 2.25. Il coenzima SAM (A) della reazione di metilazione (B).

- le O-metiltransferasi: comprendono gli enzimi microsomiali fenolo O-metiltransferasi e quelli citosolici e microsomiali catecolo O-metiltransferasi che metabolizzano substrati endogeni come l'epinefrina, la norepinefrina, la dopamina e farmaci come la L-DOPA;
- le N-metiltransferasi: tra questi enzimi sono annoverate la feniletanolamina N-metiltransferasi che catalizza la metilazione della norepinefrina ad epinefrina, l'istamina N-metiltransferasi che metila l'anello imidazolico dell'istamina e di composti analoghi, la nicotinamide N-metiltransferasi che metabolizza composti contenenti anelli piridinici come nicotinamide e nicotina ed anelli indolici come triptofano e serotonina;
- le S-metiltransferasi: le S-metilazioni sono una via di trasformazione molto importante soprattutto per gli xenobiotici tiolici come l'antireumatico D-penicillamina, l'antineoplastico 6-mercaptopurina, l'agente antitiroideo metimazolo e il disulfiram impiegato nella terapia dell'alcolismo. Sono catalizzate dalla tiopurina e tiolo metiltransferasi (Fuccella e altri, 1998).

- **Acetilazione:** è la maggior via di biotrasformazione degli xenobiotici come le ammine aromatiche e le idrazine che vengono convertite rispettivamente in ammidi e idrazidi (fig. 2.26A) in seguito al legame di un gruppo acetile attivato ($-\text{COCH}_3$) trasportato dall'acetil coenzima A (acetilCoA) (fig.2.26B)

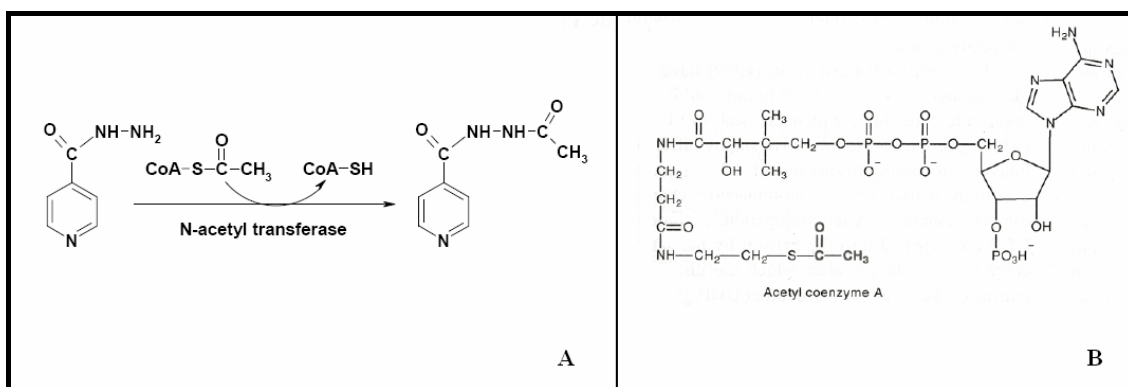


Figura 2.26. Un esempio di reazione di acetilazione (A) e l'acetilCoA (B), donatore dei gruppi acetili attivati.

Gli enzimi coinvolti sono le N-acetiltransferasi (NAT). L'uomo esprime due isoforme citosoliche di 33 kDa: la NAT1 è espressa nel fegato e in molti altri tessuti, la NAT2 è invece esclusivamente epatica. Fra i principali substrati di acetilazione vi sono l'isoniazide, l'idralazina, la procainamide e il β -bloccante acebutololo (Weber, 1997).

- **Acilazione (coniugazione con aminoacidi):** si tratta di un processo coniugativo in cui i substrati, prevalentemente acidi carbossilici, vengono attivati dall'acilCoA ligasi in acilCoA-tioesteri. Questi ultimi reagiscono con il gruppo amminico di un aminoacido per formare un coniugato ammidico in una reazione catalizzata dalla acilCoA-aminoacido N-aciltransferasi (fig. 2.27).

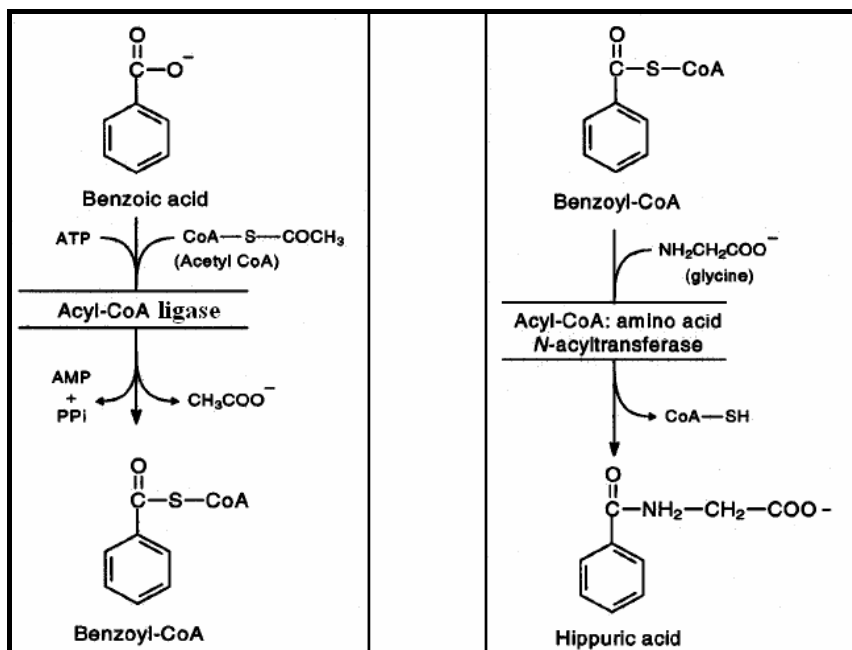


Figura 2.27. Reazione di acilazione.

Nei mammiferi i principali aminoacidi che prendono parte alla reazione sono la glicina, la glutammina, l'arginina e la taurina. Tra i composti più noti che sono soggetti a questo tipo di coniugazione vi sono l'acido para-amminobenzoico e l'acido nicotinico (entrambi con glicina) e derivati fenilacetici (con glutammina). Un particolare tipo di coniugazione riguarda gli acidi biliari con taurina (Fuccella e altri, 1998).

2.7 Enzimi e sistemi di fase III

Le reazioni di fase III sono meno note, ma possono avere grande importanza soprattutto di tipo tossicologico. Si tratta di processi a sede citoplasmatica ed intestinale che comprendono:

- **idrolisi di glucuronidi;**
- **idrolisi di acidi mercapturici (coniugati con glutazione);**
- **aromatizzazioni;**
- **riduzioni di composti precedentemente ossidati dal fegato.**

In tal modo si possono, in certa misura, venire a capovolgere i processi metabolici operati dal fegato e consentire quindi l'instaurarsi di un ricircolo enteroepatico di composti; metabolizzati nel fegato, escreti tramite la bile nell'intestino e in questa sede ripristinati e riassorbiti.

Appartengono a questa fase del metabolismo anche le **reazioni di trasporto extracellulare**. Queste ultime sono catalizzate da proteine transmembrana che, sfruttando il meccanismo del trasporto primario (cioè l'energia fornita dall'idrolisi dell'ATP) estrudono i loro substrati al di fuori della cellula diminuendone la concentrazione intracellulare. Tali pompe di efflusso appartengono alla superfamiglia delle *ATP binding cassette* o trasportatori ABC. Le proteine ABC funzionalmente mature sono dotate di due domini transmembrana molto variabili e deputati al riconoscimento del substrato e di due domini citoplasmatici estremamente conservati per il legame dell'ATP (fig. 2.28).

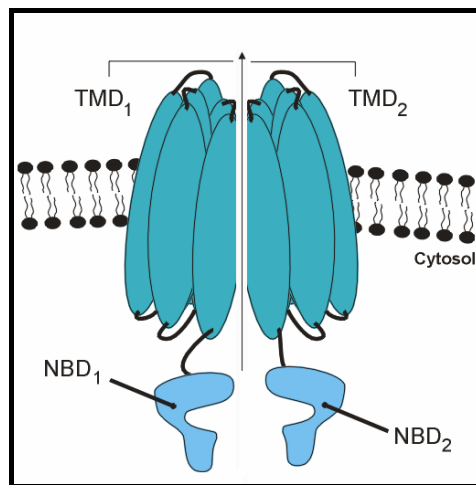


Figura 2.28. Organizzazione strutturale degli ABC *transporters*: sono mostrati i due domini citoplasmatici di legame per i nucleotidi (NBD) e i due domini transmembrana (TMD).

Le dodici α -eliche che costituiscono i due domini transmembrana individuano un poro che, grazie all'energia fornita dall'idrolisi di due

molecole di ATP, passa da una conformazione chiusa a quella aperta che consente a composti metabolizzati e non di substrati endogeni ed esogeni di attraversare la membrana. In questo modo i trasportatori ABC proteggono la cellula dall'esposizione a sostanze potenzialmente tossiche e a tale scopo sono generalmente espressi in siti strategici dove limitano l'assorbimento intestinale e favoriscono l'escrezione biliare e urinaria (Ejendal e altri, 2002).

Il genoma umano codifica per 48 trasportatori ABC suddivisi in sette famiglie (ABC A-G) ciascuna dotata di più membri funzionali. Nell'ambito del trasporto degli xenobiotici, le più importanti proteine di efflusso appartengono alle famiglie B, C e G e sono, rispettivamente, la glicoproteina-P (P-gp o MDR1) e la *sisterP-gp* (SPGP o BSEP), le *multidrug resistance associated protein 1, 2, 3, 4* (MRP 1, 2, 3, 4) e la *breast cancer resistance protein* (BCRP).

A causa della loro frequente overespressione nelle cellule tumorali, queste proteine sono associate al fenomeno della farmacoresistenza multipla, cioè la capacità delle cellule cancerose di resistere all'attività antitumorale di un farmaco al quale sono state ripetutamente esposte e successivamente anche a quella di agenti con i quali non sono mai state trattate.

La P-gp è localizzata nell'orletto a spazzola degli enterociti intestinali e delle cellule epiteliali dei tubuli prossimali dei reni, sulla membrana che circonda i canalicoli biliari nel fegato, nelle cellule endoteliali della barriera ematoencefalica e sul versante apicale di molte altre cellule polarizzate. In tutti i siti in cui è localizzata, la P-gp agisce da pompa di efflusso diminuendo la concentrazione intracellulare di molecole potenzialmente tossiche. È un trasportatore dotato di una vastissima specificità di substrato: si tratta prevalentemente di composti di natura lipofila strutturalmente molto diversi tra di loro. Tra questi vi sono numerosissimi farmaci antineoplastici tra cui gli alcaloidi della *Vinca Rosea*, la colchicina e gli antibiotici antraciclinici. Fra i composti endogeni riconosce come substrati lipidi, steroidi e peptidi.

La SPGP è espressa quasi esclusivamente nelle membrana che circonda i canalicoli biliari epatici dove media l'escrezione dei sali biliari. Riconosce come substrati una grande varietà di farmaci che la inibiscono causando colestasi: tra questi l'immunosoppressore ciclosporina, la rifampicina, la cloxacillina e numerosi farmaci antidiabetici tra cui gliburide e troglitazone (Mizuno e altri, 2003).

Le MRP sono trasportatori che traggono la loro denominazione dal fenomeno di farmacoresistenza multipla al quale danno origine.

La MRP1 è espressa principalmente sulle membrane sinusoidali degli epatociti. Riconosce e media il trasporto extracellulare di substrati idrofobici e anioni organici coniugati tra cui solfo- e glucuronoconiugati, ma soprattutto coniugati del glutatione. E' coinvolta nell'estrusione cellulare di doxorubicina, daunorubicina, vincristina, etoposide, colchicina e rodamina. Tra i substrati endogeni riconosce il leucotriene C₄.

La MRP2 è localizzata nell'orletto a spazzola delle membrane degli enterociti e delle cellule epiteliali dei tubuli prossimali dei reni e nelle membrane canalicolari degli epatociti dove media l'escrezione di anioni organici e di coniugati del glutatione e del glucuronato (bilirubina, diclofenac, SN-38). E' inoltre in grado di mediare l'escrezione biliare di anioni organici non coniugati tra cui l'antibiotico fluorochinolone grepafloxacin, antibiotici β-lattamici e metotrexato.

Il trasportatore MRP3 è localizzato nelle membrane basolaterali degli enterociti e in quelle sinusoidali degli epatociti. E' principalmente un trasportatore di anioni organici e di glucuronoconiugati. E' coinvolto nella resistenza al metotrexato e dell'etoposide.

La MRP4 è espressa nell'orletto a spazzola delle membrane delle cellule epiteliali dei tubuli prossimali dei reni. Conferisce resistenza agli analoghi nucleosidici impiegati nel trattamento dell'HIV e delle neoplasie (Glavinas e altri, 2004).

La BCRP è espressa nell'orletto a spazzola delle membrane degli enterociti, nelle membrane canalicolari degli epatociti, nella placenta e

nelle cellule staminali ematopoietiche. Riconosce ed espelle dalle cellule numerosi antiblastici tra cui antracicline, CPT-11, mitoxantrone, topotecano e probabilmente anche metotrexato e sonde come la Rodamina 123 e l'Hoechst 33462. Anche in questo caso la proteina è overespressa in cellule cancerose soprattutto delle masse tumorali del seno (Dean, 2001).

CAPITOLO 3

NATURA E VARIABILITA' DEGLI ENZIMI DEL *DRUG-METABOLISM*

Gli enzimi del *drug-metabolism* presentano due caratteristiche fondamentali. La prima riguarda la doppia natura bioattivante/detossificante di cui sono dotati. La seconda è invece rappresentata dall'ampia variabilità inter- e intraindividuale nella capacità di metabolizzare una determinata sostanza. Entrambi questi aspetti verranno trattati di seguito.

3.1 La doppia natura degli enzimi

In generale, gli enzimi e le reazioni di fase I, II e III vengono indicati come un sistema di detossificazione in grado, cioè, di proteggere l'organismo da una prolungata esposizione a xenobiotici potenzialmente nocivi. In realtà, appare sempre più evidente che il metabolismo di farmaci ed altre sostanze esogene non rappresenta sempre un evento biochimico innocuo che porta alla detossificazione ed alla eliminazione del composto. Come anticipato nel capitolo precedente, infatti, la gamma di effetti che le reazioni di biotrasformazione catalizzate dagli enzimi del *drug-metabolism* possono avere sui loro substrati è molto ampia e non è raro il caso in cui si possa verificare la produzione di metaboliti nocivi ed elettrofilici in grado di esercitare la loro tossicità attraverso la formazione di addotti con le macromolecole nucleofile della cellula o la deplezione delle difese ossidative (fig. 3.1) (Guengerich, 2006).

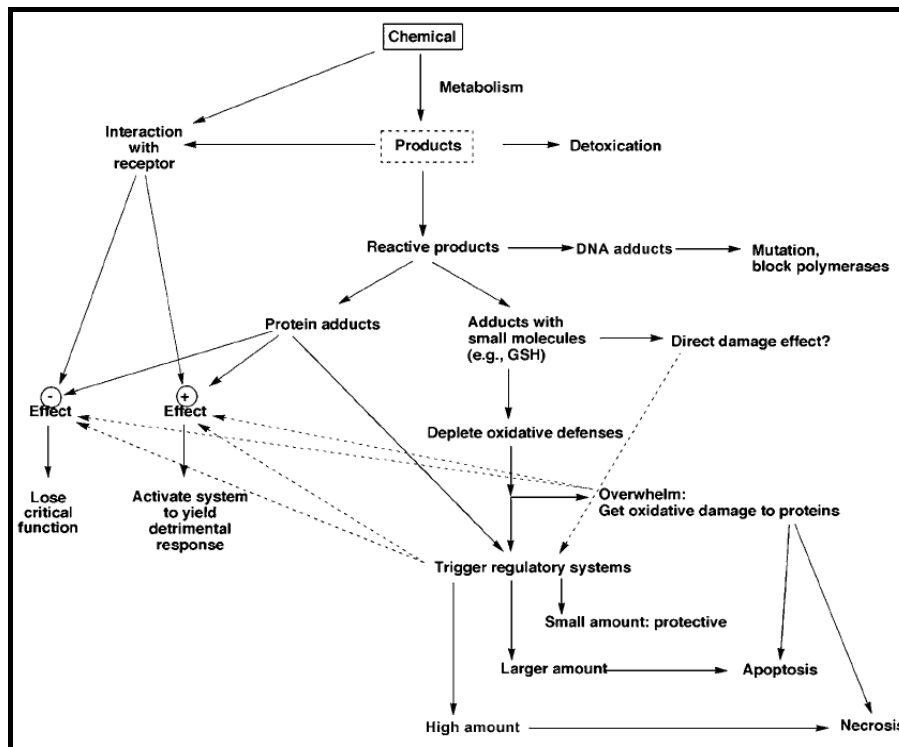


Figura 3.1. Eventi biologici coinvolti nel meccanismo di tossicità degli xenobiotici e dei loro metaboliti.

Come illustrato precedentemente (cap. 1), è opinione diffusa che tali metaboliti reattivi vengano generati dagli enzimi di fase I (principalmente CYP), universalmente considerati “bioattivanti”, in contrasto con gli enzimi post-ossidativi di fase II che, coniugando gli xenobiotici e i loro metaboliti con substrati endogeni più polari, sono ritenuti “detossificanti”. Questa distinzione convenzionale è però ormai superata da oltre due decenni (Guengerich, 1985). Secondo le nuove evidenze sperimentali, infatti, ciascun enzima, sia esso di fase I, II o III, ha una duplice natura bioattivante/detossificante che non dipende dall’enzima in sé, ma dalla struttura chimica dei substrati con cui quest’ultimo interagisce: ciascun enzima è quindi in grado di bioattivare alcune sostanze e nello stesso tempo di detossificarne altre (Paolini e Legator, 1992; Paolini e altri, 1994a).

Un esempio è rappresentato dalle multiple vie metaboliche a cui può essere soggetto il pesticida 2-amminofluorene (2-AF) (fig. 3.2). In tre possibili *pathways* mediati dal CYP (principalmente CYP1A2) tale composto è metabolizzato sia negli intermedi inattivi 5-idrossi-AF e 5,7-diidrossi-AF che nell'inattivo 2-idrossi-AF. Quest'ultimo può essere metabolizzato dagli enzimi di fase II SULT e NAT rispettivamente nel metabolita attivo N-idrossisolfato-AF e nella protossina N-idrossi-N-acetil-AF che può anche generarsi dalla molecola parentale per azione sequenziale della NAT e dei CYP. L'N-idrossi-N-acetil-AF può andare successivamente incontro ad acetilazione con la produzione dell'N-acetossi-AF (generato anche dal 2-idrossi-AF per azione di una O-NAT) che spontaneamente può riarrangiarsi (come accade per l'N-idrossisolfato-AF) a formare uno ione nitrenio reattivo in grado di dar luogo ad addotti con il DNA. In un'altra possibile via, l'N-idrossi-N-acetil-AF può essere metabolizzato dalle SULT per formare l'instabile N-idrossisolfato-N-acetilAF che può riarrangiarsi per formare lo ione N-acetilnitrenio in grado di legare le macromolecole biologiche. Infine, l'N-idrossi-N-acetil-AF può essere metabolizzato dall'UGT a formare un glucuronoconjugato che può essere idrolizzato dalle β -glucuronidasi (fase III) della microflora intestinale e liberare così un N-idrossi-derivato. Quest'ultimo può essere acetilato dalla NAT e generare in questo modo un intermedio in grado di reagire con il DNA.

3.2 La variabilità

Il riscontro di ampie variazioni nella capacità di metabolizzare una determinata sostanza sono di comune conoscenza: non solo sono caratteristiche di un individuo, ma possono anche variare nel tempo in uno stesso soggetto. Tali differenze si riflettono in corrispondenti variazioni del contenuto e dell'attività catalitica degli enzimi epatici del *drug-metabolism* e sono dovute a numerosi cause tra le quali le più rilevanti sono rappresentate:

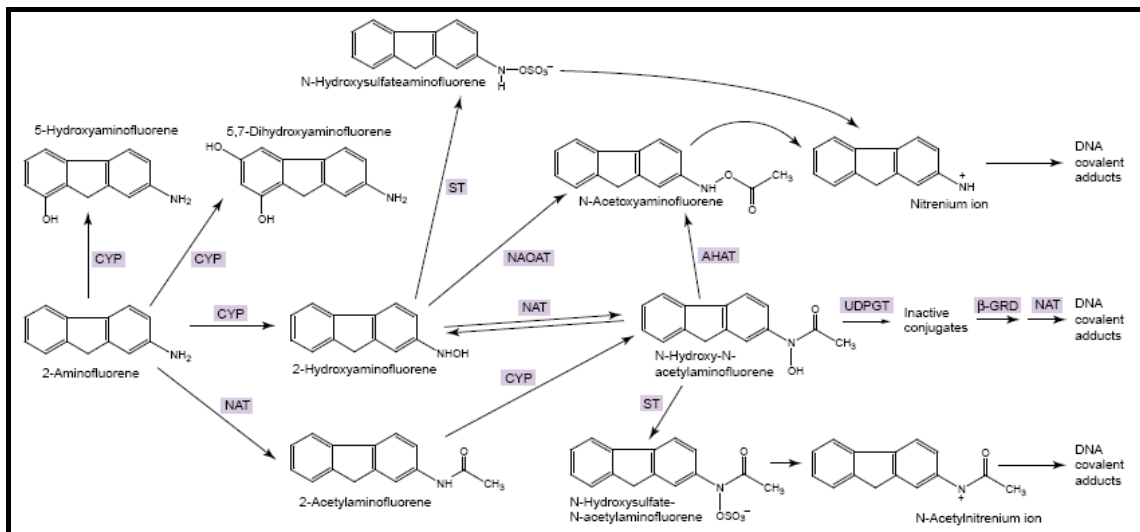


Figura 1.2. Possibili *pathways* metabolici del pesticida 2-amminofluorene. CYP = citocromo P450; NAT = N-acetiltransferasi; NAOAT = N-idrossi-O-acetiltransferasi; AHAT = aril-acido idrossamico-acetiltransferasi; UDPGT = glucuroniltransferasi; ST = solfottransferasi.

- dalla capacità degli enzimi di essere modulati, cioè indotti (*up-regulated*) o inibiti (*down-regulated*), da esposizioni ambientali e nutrizionali;
- da fattori genetici tra i quali i più significativi sono i polimorfismi.

3.2.1 La modulazione delle isoforme CYP

a) Induzione

Nell'epatocita in condizioni "basali", cioè in assenza di qualsiasi contatto con sostanze induttrici, è possibile riscontrare circa una dozzina di isoforme diverse di CYP, ma molte di più compaiono in seguito anche alla semplice esposizione del soggetto all'ambiente. L'estrema sensibilità dei CYP alle perturbazioni ambientali si è evoluta come risposta adattativa agli insulti ambientali e nutrizionali. Tale risposta è volta all'eliminazione nel più breve tempo possibile dello stress cellulare derivante dall'esposizione agli xenobiotici ed è

realizzata attraverso l'induzione, cioè l'aumento del contenuto e dell'attività catalitica, dei CYP (soprattutto delle famiglie 1, 2, 3 e 4) (Rushmore, 2002).

Numerosi composti si sono mostrati in grado di indurre i CYP. Tali agenti sono stati suddivisi in due classi in base al tipo di attività mostrata: MONOFUNZIONALI, in grado di indurre l'attività degli enzimi di fase I o II e BIFUNZIONALI, coinvolti nell'induzione degli enzimi sia di fase I, sia di fase II. Questa induzione può esplicarsi a diversi livelli: trascrizionale, post-trascrizionale e post-traduzionale.

- Controllo trascrizionale:

Rappresenta il meccanismo d'elezione nell'ambito dell'induzione dei CYP. Tale induzione è mediata dai cosiddetti recettori nucleari orfani: membri della superfamiglia dei recettori nucleari che esprimono le medesime caratteristiche strutturali dei recettori nucleari ormonali e sono così definiti per il fatto di essere stati identificati senza un preliminare riconoscimento di un ligando fisiologicamente rilevante. Si tratta di fattori trascrizionali che rappresentano l'interfaccia tra il genoma umano e l'ambiente e per questo motivo sono definiti anche xenosensori. Si tratta di mediatori della risposta agli xenobiotici che riconoscono a bassa affinità una vasta gamma di molecole esogene (ed endogene), generalmente piccole e lipofile, in grado di mediarne l'attivazione (Xie e altri, 2001). Tali proteine presentano una organizzazione strutturale assai conservata che consiste di quattro moduli funzionali indipendenti e ben definiti (fig. 3.3).

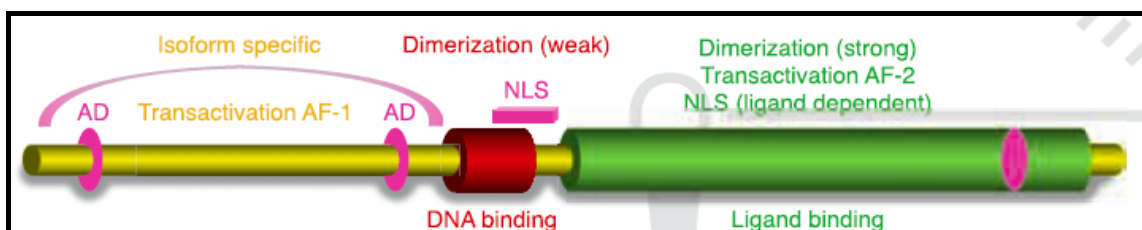


Figura 3.3. Struttura dei recettori nucleari orfani. In giallo è mostrato il dominio modulatore, in rosso il DBD e in verde il LBD. Fra questi ultimi due è localizzato il dominio a cerniera con la NLS (in fucsia).

A partire dall'estremità N-terminale, il primo modulo è rappresentato dal dominio modulatore o A/B. Presenta la maggior variabilità in termini di lunghezza e sequenza primaria in quanto è deputato all'interazione con cofattori e promotori cellula-specifici. Possiede inoltre una funzione di attivazione trascrizionale costitutivamente attiva e ligando indipendente chiamata AF-1 e diversi domini autonomi di transattivazione detti AD.

Il secondo modulo è rappresentato dal dominio di legame per il DNA (DBD) o dominio C. E' la parte di proteina maggiormente conservata con un livello di omologia tra le specie che arriva al 93-94%. E' costituito da due *zinc-finger* dei quali il primo, mediante la P-box, è coinvolto nel riconoscimento del DNA, mentre il secondo, attraverso la D-box, è implicato nella funzione di dimerizzazione. Al C-terminale dei due zinc-finger è inoltre presente il sottodominio CTE che partecipa alle interazioni proteina-proteina e proteina DNA. (fig. 3.4).

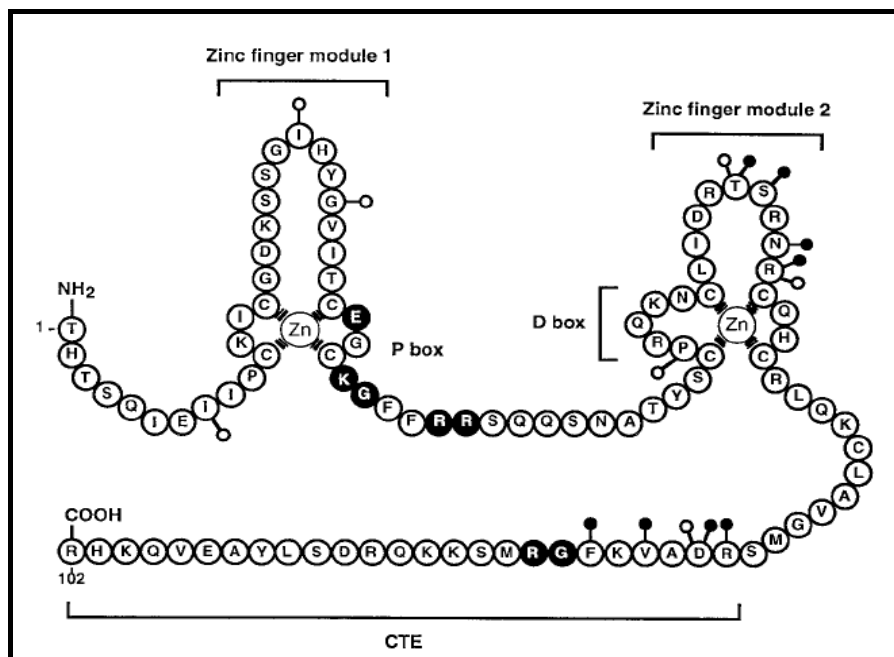


Figura 3.4. Sottodomini del DBD dei recettori nucleari orfani. In nero sono mostrati i residui che contattano il DNA.

Il terzo modulo è rappresentato dal dominio cerniera o D. Anche questa è una regione dei recettori molto variabile. E' una zona molto flessibile che consente al DBD di ruotare di 180° e legare il DNA in differenti orientazioni. E' inoltre dotato di una sequenza di localizzazione nucleare (NLS) che media il trasferimento della proteina nel nucleo.

L'ultimo modulo è il dominio di legame per i ligandi (LBD) o dominio E. Si tratta di un dominio multifunzionale dotato di elementi di struttura secondaria principalmente α che individuano una cavità di legame per i ligandi ben nascosta all'interno del dominio. Il LBD è inoltre coinvolto nella dimerizzazione dei recettori, nell'interazione con le *heat shock proteins*, nella localizzazione nucleare e in una funzione di attivazione trascrizionale strettamente ligando-dipendente (Giguère, 1999). Quest'ultima è mediata da un sottodominio di transattivazione detto AF-2, che, in seguito al cambiamento conformazionale indotto dal legame dei ligandi, diventa disponibile all'interazione con diversi co-attivatori (Escriva e altri, 2000). Anche questo è un dominio scarsamente conservato e piuttosto divergente ed è questa variabilità che, insieme a quella del dominio modulatore, sembra rendere ragione della capacità dei recettori di riconoscere ligandi strutturalmente diversi, delle differenze interspecifiche nel potenziale induttivo degli xenobiotici e quindi nei profili di attivazione recettoriale (Handschin e altri, 2001).

Oltre alla struttura, anche il meccanismo d'azione è assai conservato.

In generale, i recettori nucleari orfani possono legare il DNA come monomeri, omo- o eterodimeri in associazione con il recettore X dei retinoidi (RXR). Le sequenze riconosciute prendono il nome di elementi di risposta agli ormoni (HRE) o agli xenobiotici (XRE) e sono costituite da una (nel caso di legame da parte di un monomero) o due (nel caso di legame da parte di un dimero) emi-sequenze esameriche AGGTCA organizzate come ripetizioni dirette (DR), invertite (IR) o evertite (ER) separate da un numero variabile di nucleotidi (fig. 3.5) e presenti nelle regioni regolatrici dei geni per gli

enzimi di fase I (di fase II , III o per gli enzimi coinvolti nella sintesi dei gruppi prostetici o dei coenzimi coinvolti nelle reazioni di biotrasformazione) (Handschin e altri, 2003).

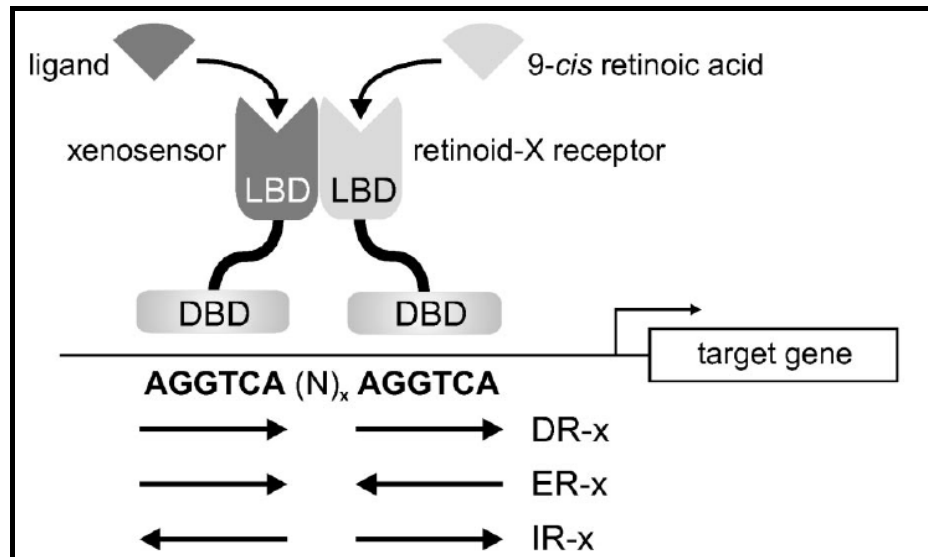


Figura 3.5. Modalità di legame dei recettori orfani nucleari alle sequenze HRE o XRE. X indica il numero di nucleotidi spaziatori fra le due sequenze ripetute.

In generale il meccanismo d'azione di questi recettori prevede tre tappe fondamentali: quella di repressione, di derepressione e di transattivazione. Lo stato di repressione è caratterizzato dalla presenza nel citoplasma del recettore inattivo, complessato alle *heat shock proteins* e a corepressori dotati di attività di istone deacetilasi che mantiene la cromatina in uno stato trascrizionalmente silente. In seguito al legame del ligando si verifica la derepressione del recettore: i corepressori vengono rilasciati, mentre viene reclutato un complesso proteico coattivatore in grado di acetilare gli istoni, attività necessaria per l'attivazione trascrizionale dei geni *target*. Infine quest'ultimo complesso viene rilasciato a favore di un nuovo coattivatore in grado di contattare l'apparato basale di trascrizione e consentire così l'inizio della trascrizione (Robinson-Rechavi e altri, 2003).

Fra i recettori nucleari orfani coinvolti nell'induzione degli enzimi di fase I vi sono:

- **i recettori X per i retinoidi (RXRs)**: è una famiglia costituita dai tre membri α , β e γ che sono espressi in modo ubiquitario. I ligandi ad alta affinità per tale recettore sono rappresentati dall'acido metoprene, dall'acido titanico, ma soprattutto dall'acido retinoico-9-cis che, attraverso l'azione dei recettori RXRs, è coinvolto nella morfogenesi dell'occhio. Nell'ambito del meccanismo dell'induzione, gioca un ruolo molto importante come *partner* di dimerizzazione con altri recettori nucleari orfani. In particolare gli RXRs possono formare due tipi di eterodimeri: permissivi e non permissivi. I primi possono essere attivati sia dai ligandi degli RXRs che da quelli dei *partners* di dimerizzazione, mentre nei secondi gli RXRs sono completamente silenti ed il complesso eterodimerico può essere attivato solo dai ligandi dei *partners* di dimerizzazione degli RXRs. Grazie alla capacità di interagire con numerosi recettori nucleari orfani è coinvolto nell'attivazione trascrizionale di numerose isoforme di CYP.
- **il recettore X per il pregnano (PXR)**: è espresso principalmente nel fegato e nell'intestino. E' un recettore che eterodimerizza con gli RXRs e riconosce DR3. I ligandi endogeni di questo recettore sono i pregnani (steroidi a 21 atomi di carbonio), mentre, tra gli xenobiotici, agonisti dei glucocorticoidi e antiglicocorticoidi come, rispettivamente, il desametasone e il pregnenolone 16- α -carbonitrile (PCN) risultano dei potenti attivatori di tale recettore nei roditori. L'ortologo umano SXR (recettore per gli steroidi e gli xenobiotici) al contrario non è attivato da PCN, ma dalla rifampicina. Ad ogni modo, la loro attivazione è responsabile dell'induzione della sottofamiglia CYP3A e conseguentemente dell'aumento nei livelli di idrossilazione degli ormoni steroidei e di numerosi xenobiotici.

- **i recettori costitutivi per l'androstano (CARs):** è una famiglia di recettori costituita dai due membri α e β espressi principalmente nel fegato e in misura minore nell'intestino. E' definito in tale modo perché, in forma eterodimerica con gli RXRs, attiva la trascrizione dei geni *target* in assenza di ligandi. La costitutiva attivazione di questo recettore può però essere regolata sia negativamente che positivamente. In particolare due metaboliti dell'androstano, l'androstanolo e l'androsteno, agiscono da agonisti inversi endogeni in quanto mediano la dissociazione dei CARs dai loro coattivatori e quindi la loro inattivazione. Tale effetto negativo può però essere sovvertito da induttori come il fenobarbital e il pesticida TCPOBOP che, attraverso tale recettore, mediano l'induzione trascrizionale della sottofamiglia CYP2B i cui membri sono dotati di una sequenza regolativa di 51-bp molto complessa detta *phenobarbital-response element module* (PBREM).
- **Recettori per il proliferatore attivato dei perossisomi (PPARs):** anche questa è una famiglia formata da tre membri (α , β e γ) che eterodimerizzano con gli RXRs e riconoscono delle DR1. Le tre forme presentano un distinto *pattern* di espressione tissutale: l'unico tessuto in cui sono espresse tutte e tre è quello adiposo bianco o bruno. A livello fisiologico infatti questa famiglia di recettori è coinvolta nella regolazione dei geni implicati nel metabolismo dei carboidrati e dei lipidi. Questi recettori, in particolare la forma α , sono attivati dai proliferatori perossisomali, un gruppo di composti strutturalmente non correlati che comprendono molecole endogene come gli acidi grassi e gli eicosanoidi e xenobiotici come FANS, antidiabetici e ipolipidemizzanti come il clofibrato che inducono proliferazione perossisomica che è connessa a iperplasia del fegato e tumori epatici. Essi agiscono attivando i PPARs che, con RXR, legano gli elementi di risposta ai proliferatori perossisomali presenti nelle regioni

promotoriali delle isoforme della famiglia CYP4, coinvolta nel metabolismo del colesterolo e nell'idrossilazione degli acidi grassi. In misura minore ma significativa vengono indotti anche i CYP2B1, CYP2B2 e CYP3A1.

- **i recettori X epatici (LXRs)**: è una famiglia a cui appartengono il membro α e β implicati nel riconoscimento di elementi DR4 insieme agli RXRs con i quali formano complessi permissivi. Il primo è espresso principalmente nel fegato, ma anche nell'intestino, nella milza e nei reni. La forma β è invece espressa in modo ubiquitario. Questi recettori sono attivati dall'acido retinoico-9-cis ed in particolar modo dagli ossisteroli, derivati ossidati del colesterolo che fungono da intermedi nelle vie biosintetiche degli ormoni steroidei e degli acidi biliari. La loro attivazione determina l'induzione dell'isoforma CYP7A1 che codifica per la 7- α -idrossilasi che metabolizza il colesterolo in acidi biliari: per questo motivo tali recettori vengono spesso indicati come sensori dei livelli di colesterolo.
- **il recettore X del farnesoide (FXR)**: questo recettore è espresso principalmente nel fegato dove riconosce, in un complesso eterodimerico con gli RXRs, IR-1 o DR-4 presenti nelle sequenze regolatrici dei geni *target*. Tra questi vi è il CYP7A1 sul quale ha un effetto complementare rispetto ai recettori LXR: l'accumulo di acidi biliari, attivatori naturali dell'FXR, determina infatti un'inibizione trascrizionale del CYP7A1 e una transattivazione del gene per la proteina intestinale di legame per gli acidi biliari. Agendo a questi due livelli, l'FXR determina rispettivamente una diminuzione della biosintesi e un aumento del ricircolo intestinale di acidi biliari: per questo motivo tale recettore è considerato un sensore dei livelli di questi ultimi. Oltre agli acidi biliari, un altro forte induttore dell'FXR è il farnesolo, un intermedio isoprenico nella via di biosintesi del mevalonato.

- **i recettori fushi tarazu-factor-1 (FTZ-F1s)**: questa famiglia comprende la forma FTZ-F1 α e β , due recettori monomerici la cui attività è probabilmente regolata da ligandi come gli ossisteroli, ma soprattutto da eventi di fosforilazione. Media l'induzione trascrizionale delle idrossilasi steroidee CYP11A, CYP11B2 e CYP21: attraverso tale modulazione questi recettori sono coinvolti nella steroidogenesi e nel differenziamento sessuale.
- **i recettori NGFI-B**: questa famiglia consta dei membri α , β e γ particolarmente espressi nel cervello a livello dei neuroni dopaminergici, ma anche nelle ghiandole surrenali, nella tiroide, nell'ipofisi, nel fegato, nelle ovaie, nei testicoli, nel timo, nelle cellule T, nei muscoli lisci e striati, nei polmoni e nella prostata. Questi recettori legano il DNA come monomeri, omodimeri (IR6) o eterodimeri permissivi (DR5) con gli RXRs. Fatta eccezione per l'acido retinoico-9-cis, nessun ligando è stato ancora individuato per i membri di questa famiglia recettoriale che è coinvolta nell'induzione dei CYP21 e 17, due idrossilasi steroidee, e pertanto, considerata l'elevata espressione a livello cerebrale, potrebbe essere implicata in disordini neurodegenerativi.
- **il recettore VDR**: poco ancora si conosce di tale recettore del quale si sa per certo che è attivato dalla vitamina D ed induce l'isoforma CYP24A1, coinvolta nel catabolismo della vitamina D stessa (Xu e altri, 2005).

Un discorso a parte merita il recettore per gli idrocarburi arilici o AhR non appartenente al gruppo dei recettori nucleari orfani, ma membro della superfamiglia dei fattori trascrizionali PAS (Per-ARNT-Sim). Questi sono strutturalmente caratterizzati dai motivi *helix-loop-helix* basici (bHLH) e da domini PAS, entrambi coinvolti in funzioni di dimerizzazione e di legame al DNA. L'AhR in assenza di ligando è localizzato nel citoplasma in un complesso multiproteico (*heat shock protein* 90, p23 e il peptide XAP) che previene l'attivazione

trascrizionale del recettore, lo mantiene in una conformazione che facilita il legame dei ligandi e maschera la sua NLS. In seguito al legame del ligando, tale complesso si dissocia e ciò consente al recettore di guadagnare il nucleo dove, in un complesso eterodimerico con il traslocatore nucleare per AhR (ARNT), attiva la trascrizione attraverso il legame a elementi di risposta alle diossine o agli xenobiotici (DRE o XRE) localizzati nelle regioni promotoriali dei geni per i CYP e per il repressore dell'AhR (AhRR). Quest'ultimo nel nucleo sequestra ARNT in un complesso inattivo impedendogli di eterodimerizzare con l'AhR. L'induzione dei CYP risulta in un aumento dello stress ossidativo che determina l'attivazione di NF- κ B che a sua volta inibisce l'AhR e, di conseguenza, l'attivazione trascrizionale dei CYP (fig. 3.6).

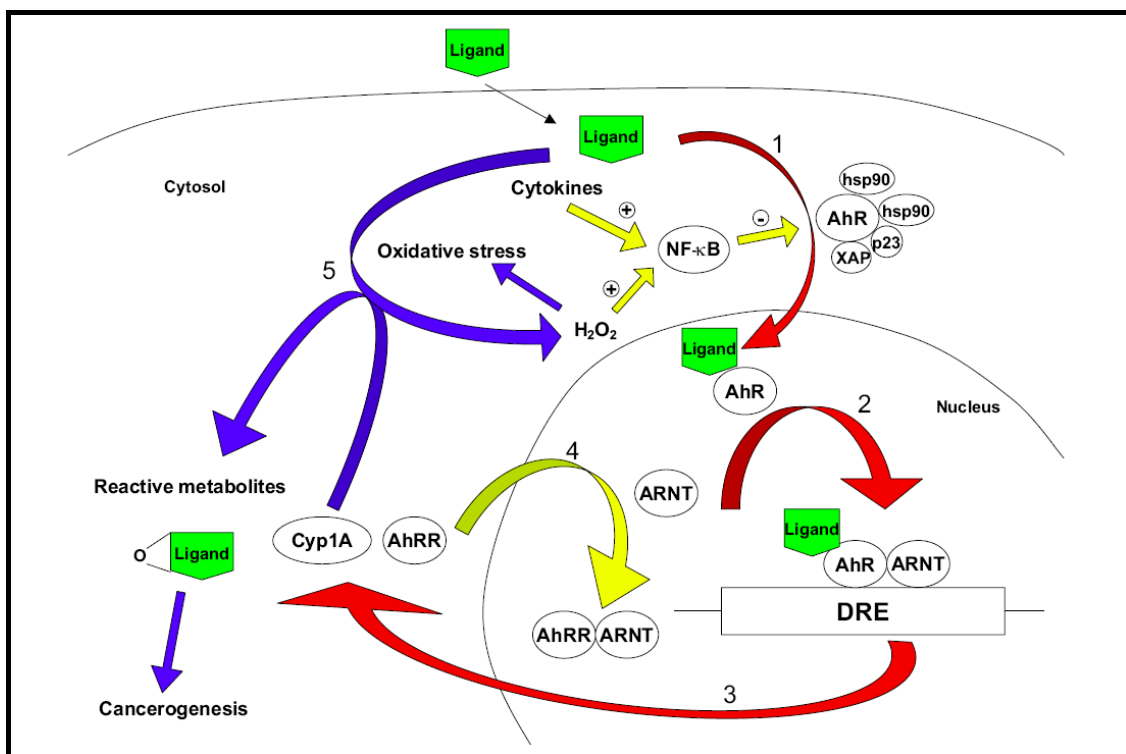


Figura 3.6. Via di trasduzione del segnale dell'AhR. Le spiegazioni sono riportate nel testo.

Fino ad oggi, nessun ligando endogeno è stato individuato per questo recettore anche se la sua esistenza viene inferita da studi condotti su topi AhR-deficienti. Questi ultimi presentano infatti difetti epatici ed immunitari. Tra gli xenobiotici, invece, numerosi sono i composti di origine naturale in grado di attivare l'AhR. Tra questi vi sono flavonoidi, carotenoidi e fenoli: si tratta tuttavia di ligandi a bassa affinità. I ligandi esogeni ad alta affinità per l'AhR sono invece rappresentati da sostanze idrofobiche e policicliche planari e non planari e tra queste sono annoverati la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-diossina (TCDD), il 3-metilclorantrene (3-MC), il benzo[a]pirene e il β -naftoflavone. Tutte queste sostanze, attraverso l'AhR, sono in grado di generare una risposta cellulare pleiotropica poiché attivano la trascrizione di numerosi geni sia di fase II come la NADPH-chinone ossidoreduttasi, le GST e le UGT che di fase I tra i quali soprattutto le isoforme della famiglia CYP1 (CYP1A1, CYP1A2 e CYP1B1) coinvolte nel metabolismo degli idrocarburi aromatici policiclici e delle diossine con un conseguente forte contributo alla cancerogenesi. Inoltre, composti di natura non policiclica e non planare come l'omeprazolo e il tiabendazolo possono attivare la via di trasduzione del segnale dell'AhR (Vrzal e altri, 2004).

E' evidente quindi che il processo di regolazione degli enzimi di fase I è estremamente complesso ed ulteriormente complicato dal fatto che un singolo gene può essere attivato da più di un recettore in un processo detto di *cross-talk*. Pare che questo fenomeno si sia evoluto grazie alla capacità dei recettori di riconoscere elementi di risposta dotati di diverse organizzazioni strutturali e come sistema di protezione secondaria nei confronti di xenobiotici potenzialmente tossici in caso di malfunzionamento dei sistemi recettoriali primari. In tal senso, emblematici sono gli esempi forniti da PXR e CAR. Inizialmente infatti tali recettori erano stati indicati come regolatori indipendenti dei CYP2B e CYP3A, rispettivamente. Appare invece sempre più evidente che questi fattori regolano due batterie di enzimi del *drug-metabolism* del tutto sovrapponibili. Attualmente sembra che

questo fenomeno interessi anche l'AhR, gli RXRs, VDR e i PPARs (Sonoda e altri, 2003).

- Controllo post-trascrizionale:

I meccanismi che intervengono a questo livello sono piuttosto rari nell'ambito dell'induzione degli enzimi di fase I. Coinvolgono sistemi in grado di agire sul trasporto, sulla stabilità e sullo splicing dell'mRNA di biosintesi. In particolare, in quest'ultimo contesto è stata dimostrata l'esistenza di differenti tipi di splicing dello stesso mRNA con conseguente sintesi di molecole ribonucleoproteiche diverse e dotate di siti iniziali e finali che, proteggendo l'mRNA dall'azione delle ribonucleasi, determinano differenti caratteristiche di stabilità nel citoplasma durante il trasporto ai ribosomi. Meccanismi di regolazione post-trascrizionale sono stati individuati per quel che riguarda l'induzione del CYP1A1 e CYP1A2 da parte del 3-MC e della TCDD e nell'induzione dei CYP2A1 e CYP3A2 da parte del desametasone.

- Controllo post-traduzionale:

La possibilità di una regolazione dell'attività dei CYP a livello di capacità catalitica e di stabilità di molecola è stata osservata in numerosi casi. Un fattore importante è per esempio il gruppo prostetico eme i cui livelli, però, hanno conseguenze complesse e non del tutto comprensibili. L'effetto di altre molecole di dimensioni più modeste quali etanolo e acetone sull'induzione del CYP2E1 appare invece più chiaro: si verifica infatti una stabilizzazione dell'enzima attivo senza alcuna variazione dei livelli di mRNA. Alcuni dati ricavati da colture cellulari di epatociti umani dimostrano che il legame con l'induttore determina una protezione della molecola con un sostanziale aumento della vita media dell'enzima (Fuccella e altri, 1998).

b) Inattivazione

Alcune sostanze sono in grado di determinare una inattivazione dei CYP, cioè diminuire il loro contenuto e la loro attività catalitica.

L'inattivazione di un'isoforma può avvenire in diversi modi, in generale si possono distinguere tre modalità principali:

- inibizione competitiva:

Due farmaci che sono metabolizzati dallo stesso CYP competono per quell'isoforma. In teoria qualsiasi coppia di farmaci metabolizzati dallo stesso P450 ha questo tipo di interazione come per esempio la ciclosporina e l'eritromicina o la ciclosporina e i calcio-antagonisti e gli antifungini che competono per il legame e il metabolismo per il CYP3A. Un altro esempio di inibitore competitivo, questa volta nei confronti del CYP2D6, è la chinidina.

- inibizione non competitiva o suicida:

Esistono poi alcuni farmaci e xenobiotici vari che vengono metabolizzati da un citocromo e poi si legano irreversibilmente al gruppo eme o alla proteina determinando una loro inattivazione irreversibile o suicida. Esempi di inibitori non competitivi sono rappresentati dalla cimetidina e altri H₂ antagonisti che legano direttamente il ferro eminico inibendo la funzionalità dell'enzima. Anche alcuni metaboliti di certi antibiotici della classe dei macrolidi sono noti per legare irreversibilmente il gruppo eme. Infine, anche gli epossidi derivati dal metabolismo delle olefine sono in grado di alchilare gli atomi di azoto degli anelli pirrolici dell'eme inibendo in modo suicida i citocromi (Fuccella e altri, 1998).

- inattivazione dei recettori nucleari orfani:

Non è raro il caso in cui i recettori leghino ligandi in grado di renderli trascrizionalmente silenti: due esempi citati precedentemente sono rappresentati dall'androstanolo e dall'androstenolo che agiscono da agonisti inversi endogeni nei confronti dei CARs in quanto mediano la loro dissociazione dalle proteine coattivatrici e quindi la loro inattivazione trascrizionale.

3.2.2 La modulazione degli enzimi di fase II

a) Induzione

Il meccanismo d'induzione dei geni per gli enzimi di fase II si basa principalmente su due vie di segnalazione che agiscono in modo sinergico: la via delle MAP chinasi (MAPK) e quella del complesso Nrf2-Keap1.

Le MAPK sono delle serina/treonina chinasi e sono importanti molecole di segnalazione che convertono segnali extracellulari, tra cui xenobiotici, in risposte intracellulari attraverso una cascata di fosforilazioni. Esistono tre vie distinte ma parallele di MAPK (ERK, JNK e p38) ciascuna delle quali consta di tre tipi di chinasi: le MAPK chinasi chinasi (MAPKKK) che fosforilano e attivano le MAPK chinasi (MAPKK) che, a loro volta, attivano e fosforilano le MAPK. Queste ultime, probabilmente insieme ad altre chinasi come PKC e PI3K, concorrono all'attivazione mediante fosforilazione di numerosi bersagli intracellulari tra cui la proteina Nrf2 (Rushmore e altri, 2002). Nrf2 è un membro della famiglia NF-E2 dei fattori trascrizionali nucleari caratterizzati da motivi basici a cerniera di leucina, mentre Keap1 è una proteina citoplasmatica ancorata, in condizioni basali, all'actina F del citoscheletro e dotata di numerosi residui di cisteina che fungono da sensori dello stress cellulare. Quest'ultimo può essere provocato dalle ROS e da un numeroso gruppo di composti elettrofili, entrambi potenti induttori delle due vie di segnalazione coinvolte nell'induzione degli enzimi di fase II accomunati dalla capacità di reagire con i gruppi tiolici (Levonen e altri, 2004).

In assenza di stimolazione (fig. 3.7), Keap1 agisce da repressore di Nrf2 sequestrandolo nel citoplasma. L'arrivo dei segnali induttivi (ROS e composti elettrofili) determina una modificazione per alchilazione od ossidazione delle cisteine di Keap1 (Dinkova-Kostova e altri, 2002) che si dissocia dal complesso con Nrf2. Quest'ultimo, in seguito ad eventi di fosforilazione mediati da diverse chinasi, trasloca nel nucleo dove dimerizza con le proteine Maf. I risultanti eterodimeri inducono gli enzimi di fase II attraverso il legame di una sequenza

regolativa detta elemento di risposta agli antiossidanti/elettrofilici (ARE/EpRE) (Nguyen e altri, 2003) presente nelle regioni promotoriali di numerosi enzimi di fase II tra cui NADPH-chinone ossidoreduttasi, GST e UDPGT (Lee e Surh, 2005).

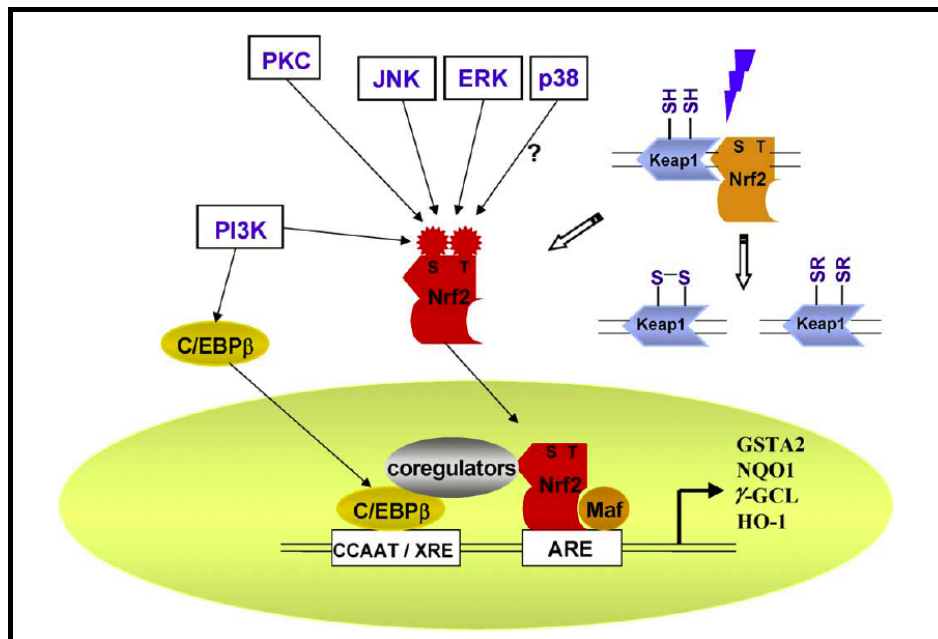


Figura 3.7. Cascata di trasduzione del segnale indotta dalle ROS e dai composti elettrofilici. Le spiegazioni sono riportate nel testo.

Accanto a questa via principale di regolazione, trova posto anche la modulazione da parte dell'AhR e dei recettori nucleari orfani che agiscono in modo coordinato inducendo gli enzimi di fase I e II. L'induzione di numerosi enzimi di fase II tra cui le isoforme UGT1A6, GST α 1 e 2 e GST μ è regolata dal 3-MC attraverso l'AhR. Il trattamento con fenobarbital, forte induttore dei CARs, modula invece positivamente l'attivazione trascrizionale dell'UGT2B1, delle GST α 1, 2 e 3 e della GST μ 1. Anche il recettore PXR sembra essere coinvolto nella regolazione degli enzimi di fase II: il suo attivatore desametasone, infatti, determina un significativo aumento degli mRNA per gli enzimi UGT1A6, UGT2B1, GST α 1, 2 e μ 1 e per le

SULT. Infine, anche il clofibrato e i PPAR inducono alcuni enzimi di fase II tra cui l'UGT1A6 e le fenolo-SULT (Rushmore e altri, 2002).

b) Inattivazione

L'inattivazione degli enzimi di fase II è basata sui medesimi meccanismi citati per i CYP. In aggiunta, frequente è l'inibizione funzionale dovuta alla deplezione dei cofattori necessari per le coniugazioni. Particolarmente soggette a questo meccanismo sono le solfatazioni: le concentrazioni di solfato nel sangue sono un bilancio tra l'assorbimento di forme inorganiche di zolfo e il suo rilascio dalla cisteina e la sua escrezione urinaria e l'incorporazione nei substrati. I livelli di solfato variano fortemente nel corso di 24 ore, in particolare in caso di ingestione di substrati (come l'acetaminofene) metabolizzati dalle SULT (Liska, 1998).

3.2.3 La modulazione degli enzimi di fase III

a) Induzione

L'induzione da parte dei medesimi composti, l'azione concertata e la colocalizzazione degli enzimi di fase III rispetto a quelli di fase II che, come esposto nel precedente paragrafo, sono a loro volta regolati in sinergia con i CYP, suggerisce una rete di regolazione coordinata, volta all'eliminazione degli xenobiotici, il cui comune denominatore è rappresentato dai recettori orfani nucleari. Numerosi sono i casi in cui sequenze specifiche per questi ultimi sono presenti nelle regioni regolatrici dei geni per i trasportatori di fase III.

Un primo esempio è fornito dalla P-gp. Induttori come il PCN e la rifampicina risultano dei potenti attivatori di tale trasportatore rispettivamente nel topo e nell'uomo. Il che suggerisce che, con ogni probabilità, l'induzione sia mediata da PXR. Recentemente, molti studi hanno dimostrato che quest'ultimo è coinvolto nella modulazione di molti altri enzimi di fase III tra cui MRP2 e MRP3. In particolare MRP2 (Catania e altri, 2004), il trasportatore di anioni

organici, è coespresso con molte isoforme di UGT e GST, a loro volta regolate in modo coordinato alla sottofamiglia CYP3A. Alla regolazione di MRP2 sembrano concorrere anche FXR e CAR: nella regione promotoriale del gene per questo trasportatore è stata infatti individuata una ER8 per la quale hanno grande affinità PXR, FXR e CAR. Per quello che riguarda invece MRP3, la sua espressione è fondamentalmente regolata dalle proteine Sp1 e 2, dal fattore trascrizionale fetoproteina α -1 (FTF), da PXR e da CAR (Xu e altri, 2005).

b) Inattivazione

Anche per gli enzimi di fase III valgono le medesime considerazioni fatte per gli enzimi di fase II: l'inattivazione dei trasportatori è basata sui medesimi meccanismi indicati per i CYP.

3.2.4 I polimorfismi genetici

Le variazioni di sequenza che rendono il genoma di un individuo diverso da quello di un altro sono relativamente poche: due soggetti non parenti fra loro infatti condividono il 99,9% della sequenza del loro DNA. Questo implica che in un genoma come quello dei mammiferi di circa 3 miliardi di bp, circa 3 milioni siano variabili o polimorfiche (Meyer, 2004). Il termine polimorfismo genetico definisce la presenza di varianti alleliche che, a livello fenotipico, si manifesta con un'incidenza di almeno l'1% rispetto ad una popolazione normale (Costa e altri, 2003).

A livello genico, le alterazioni responsabili della presenza di varianti alleliche comprendono delezioni, inserzioni, duplicazioni o più frequentemente mutazioni puntiformi dette polimorfismi di singoli nucleotidi (SNP) (Fakhoury e Jacqz-Aigrain, 2005). Questi ultimi rappresentano il tipo di mutazione più frequente: da soli infatti sono responsabili del 90% della variabilità del genoma umano (Meyer, 2004).

In ambito farmacogenetico, alterazioni della sequenza del DNA sono riscontrabili nei geni per gli enzimi del *drug-metabolism*, per i sistemi di trasporto degli xenobiotici, per gli attivatori trascrizionali e i loro elementi di risposta: non è quindi fuori luogo supporre che ciascun individuo sia dotato di un proprio profilo genetico metabolico o *fingerprint*.

Tipicamente la variabilità dei geni sopracitati può essere di tipo strutturale, cioè ricadere all'interno della regione genica codificante o regolatoria, cioè localizzata nelle regioni regolatrici non codificanti (McKinnon e Evans, 2000). In molti casi non ha conseguenze funzionali, ma in molti altri porta ad alterazioni degli aminoacidi che possono riflettersi nella generazione di un enzima con aumentata, diminuita o assente attività o espressione (Meyer e Zanger, 1997): i polimorfismi quindi sono responsabili di una “costitutiva” induzione o inibizione a carico degli enzimi (Paolini e altri, 1998). Nella popolazione tale scenario si manifesta da un punto di vista fenotipico nella distribuzione polimodale dell'attività di un enzima nei confronti di un composto noto. Tale distribuzione è caratterizzata da un massimo di quattro fenotipi: metabolizzatori ultrarapidi, rapidi, intermedi e lenti (fig. 3.8).

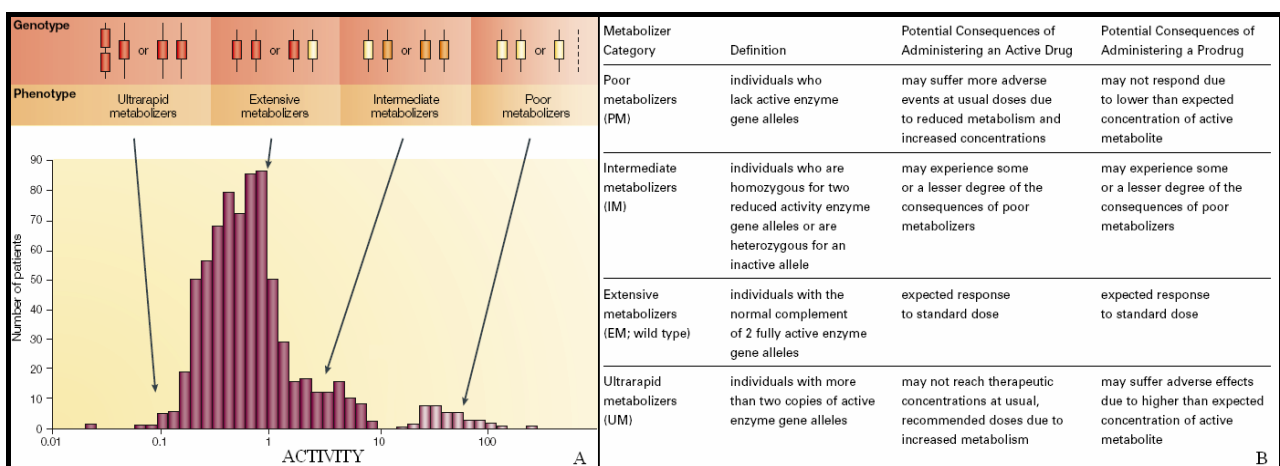


Figura 3.8. Distribuzione polimodale dell'attività di un enzima polimorfico (A) e relative conseguenze cliniche (B).

I metabolizzatori ultrarapidi presentano duplicazioni o amplificazioni delle sequenze geniche codificanti per enzimi funzionali e necessitano, nel caso di xenobiotici attivi, di dosi molto elevate per raggiungere concentrazioni plasmatiche terapeutiche, mentre, nel caso di profarmaci, sono maggiormente suscettibili alla tossicità causata dall'accumulo di metaboliti attivi. I metabolizzatori rapidi sono gli individui *wild-type*: presentano due copie alleliche funzionanti e rispondono in modo atteso a dosi standard di farmaci attivi e profarmaci. I metabolizzatori intermedi sono eterozigoti per un allele che causa inattività od omozigoti per due copie alleliche a ridotta attività enzimatica, situazione che si può verificare in caso di SNP non critici nella regione promotoriale o regolatrice. I metabolizzatori lenti sono invece privi di enzimi funzionali: alterazioni dello *splicing* che determinano il salto di esoni, proteine instabili maggiormente passibili di degradazione, delezioni, SNP che determinano la formazione di prematuri codoni di stop, la sostituzione di aminoacidi critici o l'alterazione della funzione promotoriale sono le mutazioni più frequenti che determinano assenza di attività o di espressione enzimatica (Evans e Johnson, 2001). Tali soggetti, nel caso di farmaci attivi, possono andare incontro ad effetti tossici causati dall'assenza del metabolismo, mentre in caso di somministrazione di profarmaci possono non rispondere per via di concentrazioni plasmatiche di farmaco attivo troppo basse (Ingelman-Sundberg, 2004).

Le implicazioni cliniche dei polimorfismi farmacogenetici dipendono dalle funzioni svolte dagli enzimi. La presenza di varianti alleliche negli enzimi coinvolti principalmente nel metabolismo endogeno è spesso rovinosa (McKinnon e Evans, 2000). Un esempio è rappresentato dal CYP21A1: difetti genici di questa isoforma causano l'iperplasia surrenalica congenita virilizzante dovuta alla mancanza di sintesi del cortisolo. Il conseguente accumulo del precursore di quest'ultimo, il 17-idrossi-progesterone, causa una eccessiva sintesi di

testosterone con conseguente mascolinizzazione delle donne affette da questa deficienza enzimatica (Danielson, 2002).

I polimorfismi farmacogenetici degli enzimi principalmente coinvolti nel metabolismo degli xenobiotici invece non sono né necessari né sufficienti a causare una malattia, ma, più che altro, possono modificare il livello di rischio per una patologia quando vi sia l'appropriata esposizione ad agenti tossici (Nakajima e Aoyama, 2000) o portare ad un effetto terapeutico diverso da quello previsto o a reazioni avverse (ADR) (Costa e altri, 2003). Circa il 60% dei farmaci implicati in ADR sono infatti metabolizzati da enzimi di fase I con un'alta frequenza di varianti, di cui l'85% sono CYP. In particolare il CYP2D6, che possiede un elevato numero di varianti alleliche con scarsa o assente attività metabolica, è stato associato ad un'alta percentuale di ADR (circa il 30%) (Severino e Del Zoppo, 2004). Questa isoforma presenta circa 80 varianti alleliche e definisce il cosiddetto polimorfismo della debrisoquina, un ipotensivo metabolizzato da questo CYP, che presenta una distribuzione quadrimodale. In particolare il 7-9% dei Caucasiche e l'1% degli Orientali sono metabolizzatori lenti a causa della presenza di tre principali varianti alleliche: CYP2D6*3, CYP2D6*4 e CYP2D6*5 (Meyer e altri, 1997). Il CYP2D6 è una delle rare isoforme per le quali si osservano anche metabolizzatori ultrarapidi: si tratta di individui, principalmente Arabi (30%) o Etiopi (20%), dotati di moltissime copie (fino a 12) di enzima funzionale (Tanaka, 1999).

Un altro polimorfismo ossidativo di grande interesse è quello relativo alle differenze nell'idrossilazione dell'antiepilettico S-mefenitoina a 4-idrossimefenitoina, definito dal CYP2C19. Si tratta di un polimorfismo clinicamente molto importante considerato il grande numero di farmaci metabolizzati da questa isoforma (inibitori delle pompe protoniche come l'omeprazolo, benzodiazepine, antidepressivi e antimalarici come il proguanil). La distribuzione di tale polimorfismo presenta un'ampia variazione interetnica: nella popolazione caucasica infatti i metabolizzatori lenti sono piuttosto

rari, circa il 2-6%, mentre fra gli Orientali questo fenotipo è diffuso nel 20% della popolazione (Tanaka, 1999).

Anche il CYP2C9 è caratterizzato da polimorfismo. Le varianti CYP2C9*2 e CYP2C9*3 sono le principali responsabili di una diminuita attività dell'enzima. La frequenza dei metabolizzatori lenti nella popolazione caucasica ed orientale sono del tutto paragonabili a quelle riguardanti il CYP2C19 (Tanaka, 1999): questi individui sono particolarmente suscettibili alla tossicità causata dal trattamento con warfarin e fenitoina.

Nell'ambito della superfamiglia dei CYP, polimorfismi sono stati individuati anche nelle isoforme CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2A13, CYP2B6, CYP2C8, CYP2E1, CYP2J2, CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, CYP4B1, CYP5A1, CYP8A1 e CYP21A1. Fra gli altri enzimi di fase I risultano polimorfici anche l'FMO3, le monoamminossidasi, la NADPH-chinone ossidoreduttasi, l'alcol e l'aldeide deidrogenasi (Evans e Johnson, 2001).

Anche gli enzimi di fase II presentano numerose varianti alleliche. Di particolare importanza in ambito tossicologico rivestono i polimorfismi dei geni GST π 1, μ 1 e θ 1. In particolare circa il 50% della popolazione caucasica e asiatica manca dell'attività della GST μ 1 (49.9% della popolazione italiana), mentre nella popolazione africana la frequenza di genotipo nullo è pari al 26%. Per quello che riguarda la GST θ 1 invece, il 20% della popolazione caucasica presenta un genotipo nullo (16,3% della popolazione italiana), mentre in quella asiatica la frequenza è pari al 47% (Costa e altri, 2003).

Risultano inoltre polimorfiche le SULT, alcuni tipi di metiltransferasi e le UGT2B e 1A1 (Evans e Johnson, 2001). In particolare la variazione interindividuale della glucuronoconiugazione dovuta a quest'ultima isoforma sembra essere dovuta al numero di ripetizioni TA all'interno della TATA-*box* nella regione promotoriale del gene: l'allele *wild-type* presenta 6 ripetizioni TA, mentre sette e otto ripetizioni del dinucleotide sono associate ad una minore attività promotoriale (Sparks e altri, 2004).

Nella fase post-ossidativa degli xenobiotici il polimorfismo più noto è quello di acetilazione. In particolare, per la forma NAT2 è stata dimostrata una distribuzione trimodale (metabolizzatori rapidi, intermedi e lenti) della capacità di acetilare substrati noti dell'enzima come l'isoniazide. Il difetto negli acetilatori lenti sembra essere causato da una minor sintesi dell'enzima piuttosto che dalla generazione di una sua forma anomala. Ereditato come tratto autosomico recessivo, il fenotipo metabolizzatore lento è presente nel 50% della popolazione caucasica, mentre solo nel 10% degli Orientali (Tanaka, 1999).

Fra gli enzimi di fase III risultano polimorfiche le MRPs, la P-gp e la SPGP (Evans e Johnson, 2001).

Infine, anche i recettori nucleari orfani, in particolare i loro LBD (Sonoda e Evans, 2003), l'AhR (Cauchi e altri, 2001) e i relativi elementi di risposta nelle regioni promotoriali dei geni bersaglio mostrano variabilità di sequenza: questo sembra, almeno in parte, spiegare la capacità di riconoscere ligandi strutturalmente diversi, le differenze interspecifiche nelle capacità induttive degli xenobiotici e la variabilità nei profili di induzione degli enzimi in risposta agli induttori.

3.3 Conclusioni

In conclusione si può affermare che le caratteristiche (la doppia natura, la modulabilità e i polimorfismi) degli enzimi del *drug-metabolism* descritte nei paragrafi precedenti, nel loro complesso, siano responsabili delle diverse capacità metaboliche di ciascun individuo.

Lo stile di vita, le abitudini alimentari e le esposizioni ambientali esercitano infatti una modulazione chimica di tipo acquisito (*up- o down-regulation*) sul *fingerprint* genetico di tipo innato (metabolismo lento, intermedio, rapido o ultrarapido) che codifica per enzimi che hanno una doppia natura bioattivante/detossificante. Tale interazione

determina un profilo complessivo enzimatico chimico-genetico che è responsabile della dinamicità del fenotipo metabolico che, in ultima analisi, è la sola variabile in grado di offrire informazioni sulle reali capacità metabolizzanti di ciascun individuo (fig. 3.9) (Paolini e altri, 2004).

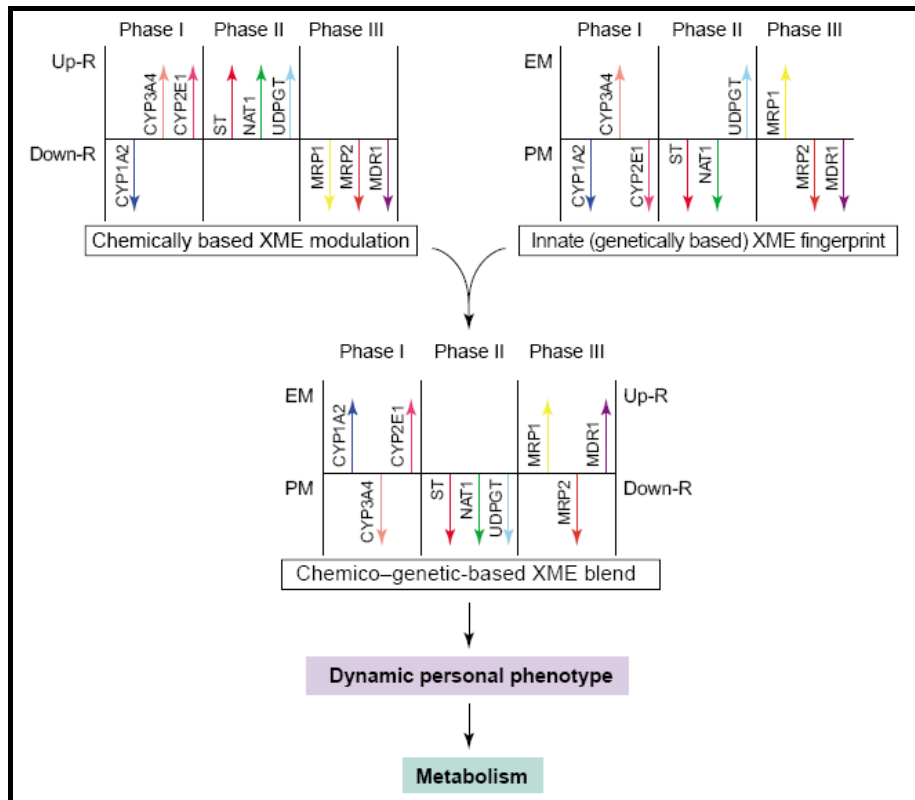


Figura 3.9. Interazione della modulazione chimica acquisita con il *fingerprint* genetico innato degli enzimi del *drug-metabolism*.

Bisogna considerare tuttavia che questo modello è una semplificazione dal momento che non tiene conto di variabili rilevanti come ad esempio:

- l'età: è un fattore importante nel metabolismo degli xenobiotici. In genere, nel neonato la maggior parte degli enzimi ossidativi sono carenti o inattivi. Assai scarsa è anche la glucuronoconiugazione, mentre la solfatazione è già attiva a

livelli adulti nel fegato, come pure l'attività idrolasica. In alcuni casi il neonato metabolizza gli xenobiotici seguendo vie diverse come nel caso della teofillina. Più complesso è il caso dell'anziano nel quale il quadro metabolico è per lo più poco modificato a meno di una riduzione del circolo epatico e renale, di una carente metabolizzazione pre-sistemica a livello gastroenterico o di un'alterata risposta recettoriale al farmaco;

- il sesso: differenze metaboliche riferite al sesso sono ben note in animali da laboratorio, molto meno nell'uomo. In generale, il bilancio tra ormoni maschili e femminili è sicuramente in grado di determinare delle variazioni nell'attività dei CYP.

CAPITOLO 4

CANCEROGENESI E STRESS OSSIDATIVO

4.1 Introduzione

Il termine stress ossidativo identifica una condizione patologica causata dalla rottura del fisiologico equilibrio fra la produzione e l'eliminazione di specie chimiche ossidanti. E' necessario precisare che le specie ossidanti sono prodotti della normale attività metabolica che, a concentrazione fisiologica, svolgono importantissime funzioni a livello cellulare e sistemico.

I metaboliti ossidanti di maggiore interesse biologico sono centrati su pochi elementi: ossigeno, azoto, carbonio, cloro, zolfo.

Nella presente trattazione, tuttavia, si farà riferimento prevalentemente alle specie reattive dell'ossigeno (*reactive oxygen species*, ROS). Quest'ultimo, infatti, non solo rappresenta l'elemento quantitativamente più importante della materia vivente e la fonte primaria della vita stessa, ma, attraverso numerosi meccanismi, è anche in grado di indurre la continua formazione di specie chimiche con caratteristiche di reattività più o meno spiccata. Tali metaboliti, di natura radicalica o meno, sono accomunati dalla tendenza a reagire con i vari substrati organici principalmente per ossidazione, ma secondariamente anche per riduzione.

4.2 Fonti di ROS

Negli organismi viventi un innalzamento dei livelli di ROS si può verificare come conseguenza dell'aumento dell'attività metabolica cellulare, tuttavia anche agenti esterni possono determinarne un incremento.

Fra le fonti endogene si possono individuare almeno sei siti: la plasmamembrana, la membrana nucleare, i mitocondri, i perossisomi, il reticolo endoplasmico liscio (REL) ed il citosol.

La plasmamembrana rappresenta una delle fonti più importanti di ROS, particolarmente (ma non esclusivamente) nei leucociti polimorfonucleati (PMN). Nella membrana plasmatica di queste cellule, infatti, sono localizzati diversi enzimi, quali la NADPH ossidasi e le lipoossigenasi: la loro attivazione in seguito a infezione, infiammazione o reazioni immunopatogene si accompagna alla produzione di metaboliti fortemente ossidanti nell'ambito del *respiratory burst*. Mentre la NADPH ossidasi catalizza la formazione di anione superossido ($O_2^{\bullet-}$) da ossigeno molecolare e NADPH ($NADPH + 2O_2 \longrightarrow NADP^+ + H^+ + 2O_2^{\bullet-}$), il sistema delle lipoossigenasi genera dall'acido arachidonico intermedi metabolici con caratteristiche di perossidi (Valko e altri, 2004).

Oltre ai suddetti enzimi, fa parte del potenziale battericida di neutrofili PMN e monociti l'enzima mieloperossidasi (MPx): localizzato nei granuli azzurrofilii delle stesse cellule, in seguito alla loro attivazione la MPx viene riversata all'esterno dove catalizza la produzione di acido ipocloridrico (HOCl), un potente ossidante, a partire dallo ione cloruro (Cl^-) e dal perossido di idrogeno (H_2O_2) (fig. 4.1) (Dale e altri, 2008).

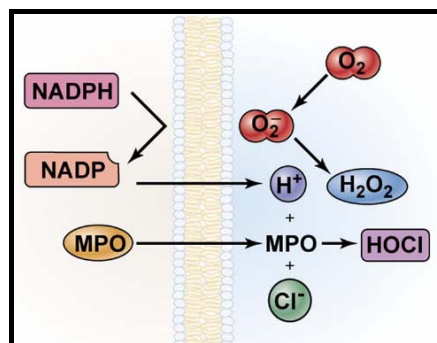


Figura 4.1. Reazione catalizzata dalla MPx.

Vi è da precisare che la NADPH ossidasi espressa dai PMN fa parte di una più ampia famiglia di ossidasi denominata Nox. Tali enzimi rappresentano per i tessuti nei quali sono espressi (colon, pelle, endotelio, muscoli, cuore, tiroide, orecchio, ecc...) una fonte di ROS: tutti e sette i membri della famiglia (Nox1-5 e Duox1 e 2), infatti, veicolano attraverso la membrana plasmatica gli equivalenti riducenti provenienti dal NADPH per ridurre l'O₂ a O₂^{•-} e/o H₂O₂ (Bedard e Krause, 2007).

Le membrane nucleari contengono citocromo ossidasi e sistemi di trasporto degli elettroni che sembrano simili a quelli dell'REL, ma la cui funzione non è ancora ben nota. Si suppone che la fuga degli elettroni da questi sistemi enzimatici possa portare alla formazione di ROS responsabili *in vivo* dei danni al DNA (Halliwell e Gutteridge, 1999).

I mitocondri rappresentano la fonte metabolica primaria di ROS perché sulle loro creste sono localizzati i complessi enzimatici della catena respiratoria deputati alla fosforilazione ossidativa. Idealmente, il trasferimento di elettroni (riduzione tetravalente) da NADH e/o FADH₂ all'ossigeno molecolare dovrebbe concludersi con la produzione di H₂O.

Questo processo tuttavia non è perfetto. E' stato infatti stimato che circa l'1-5% dell'ossigeno presente nei mitocondri può essere ridotto direttamente da elettroni che sfuggono alla catena respiratoria a monte del Complesso IV, principalmente in corrispondenza del Complesso I e Complesso III, generando così O₂^{•-} e/o H₂O₂ (riduzione uni- e bivalente dell'ossigeno molecolare) (fig. 4.2) (Lenaz, 2001).

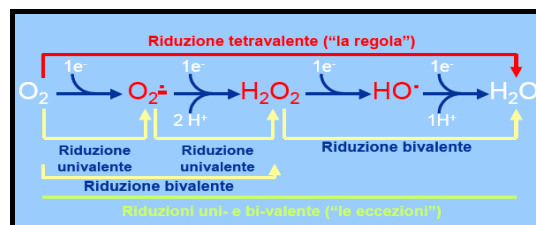


Figura 4.2. Modalità di riduzione dell'ossigeno molecolare.

A livello mitocondriale, un'altra possibile fonte di ROS è rappresentata dalle monoammino-ossidasi (MAO, A e B) che, nel catalizzare la rimozione del gruppo amminico primario dalle ammine biogeniche, determinano la formazione di H₂O₂ (fig. 4.3) (Toninello e altri, 2004).

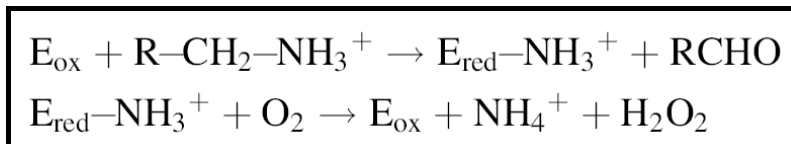


Figura 4.3. Reazione catalizzata dalle MAOs. Eox/red = enzima ossidato/ridotto.

Come i mitocondri, anche i perossisomi sono siti molto importanti di utilizzo dell'ossigeno. In questi organuli, il principale ROS prodotto è rappresentato dal H₂O₂. La sua formazione si deve alla presenza di numerose ossidasi che utilizzano l'ossigeno molecolare per rimuovere atomi di idrogeno da substrati organici specifici in una reazione di tipo ossidativo che produce H₂O₂. Una delle più importanti funzione ossidative fonte di ROS che hanno luogo nei perossisomi (particolarmente nelle cellule del fegato) è la degradazione di molecole di acidi grassi a lunga catena (β-ossidazione).

Come anticipato nel capitolo 2 (fig. 2.17), nel REL la produzione di ROS passa attraverso il sistema monoossigenasico citocromo P450-dipendente. Le principali specie coinvolte - O₂^{•-} e H₂O₂ - possono formarsi come conseguenza del decadimento del complesso tra l'enzima e l'ossigeno molecolare attivato, necessario per la funzione catalitica dell'enzima. Particolarmente coinvolte in questo processo sono le isoforme CYP2E1 e 2B, come conseguenza del metabolismo dell'etanolo e del fenobarbital, rispettivamente (Klaunig e Kamendulis, 2004).

Per quello che riguarda il citosol, numerosi sono i processi fonte di ROS. Fra questi, sono da menzionare il catabolismo dei nucleotidi purinici e la biogenesi delle poliammine.

A quest'ultimo processo partecipano le poliammido-ossidasi (PAOs), enzimi citosolici che catalizzano il taglio del legame -C-N- in gruppi amminici secondari con concomitante produzione di H₂O₂ (fig. 4.4) (Toninello e altri, 2004).

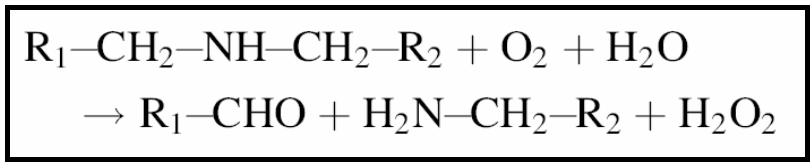


Figura 4.4. Reazione catalizzata dalle PAOs.

Nel catabolismo dei nucleotidi purinici è invece coinvolta la xantina-ossidasi. Sebbene la xantina ossidasi presente nel normale tessuto sia un enzima deidrogenasi che trasferisce elettroni a NAD⁺ ossidando la xantina o l'ipoxantina a acido urico, sotto certe condizioni di stress la deidrogenasi è convertita in un enzima ossidasi mediante ossidazione di gruppi tiolici essenziali o mediante limitata proteolisi. In seguito a questa conversione l'enzima reagisce sempre come donatore di elettroni, ma riducendo l'ossigeno invece di NAD⁺, producendo così O₂^{•-} e H₂O₂ (fig. 4.5).

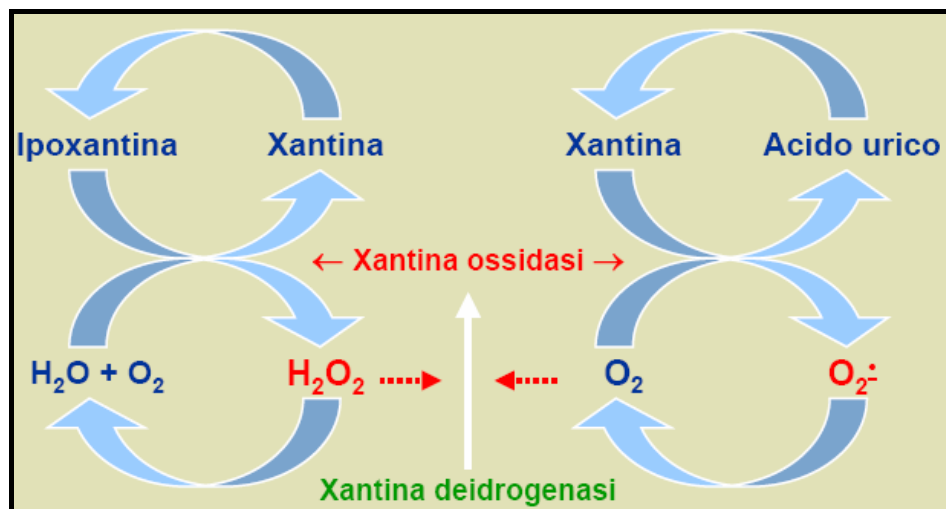


Figura 4.5. Produzione di ROS dal catabolismo purinico.

La produzione di ROS può subire un incremento notevole anche per effetto di stimolazioni esterne. Infatti, agenti fisici o chimici possono aumentarne direttamente o indirettamente la produzione.

Fra gli agenti fisici sono da menzionare le radiazioni ionizzanti e i raggi UV. Ambedue queste fonti energetiche possono indurre il fenomeno della scissione omolitica o fotolisi dell'acqua con conseguente produzione di specie radicaliche (Valko e altri, 2004).

Fra gli agenti chimici, invece, l'ozono, i metalli, taluni farmaci e molti xenobiotici come gli idrocarburi aromatici policiclici, i composti clorinati, gli esteri del forbolo, ecc... sono in grado di indurre stress e conseguente danno ossidativo *in vitro* ed *in vivo* (Klaunig e Kamendulis, 2004) attraverso svariati meccanismi.

4.3 Chimica dei ROS

Come anticipato precedentemente, i ROS possono esibire o meno una natura radicalica, a seconda che possiedano oppure no, almeno un elettrone spaiato in uno degli orbitali più esterni. Tale caratteristica, derivante dall'acquisto, dalla perdita di un elettrone oppure dalla scissione omolitica di un legame covalente, conferisce ai radicali una reattività più o meno spiccata. Quanto più è elevato il rapporto fra carica e volume, tanto più il radicale tenderà ad esistere come entità stabile, cioè dotata di tutti gli elettroni disposti in coppia.

La reattività dell'ossigeno molecolare (O_2) e delle sue specie parzialmente ridotte può quindi essere spiegata analizzando la struttura dei loro orbitali molecolari e il valore dei potenziali di ossido-riduzione (fig. 4.6).

L' O_2 presenta una configurazione elettronica del tutto peculiare ed è esso stesso un radicale (diradicale) poiché presenta due elettroni con *spin* parallelo spaiati negli orbitali π di antilegame. Come si evince dal suo potenziale di ossido-riduzione, è relativamente stabile.

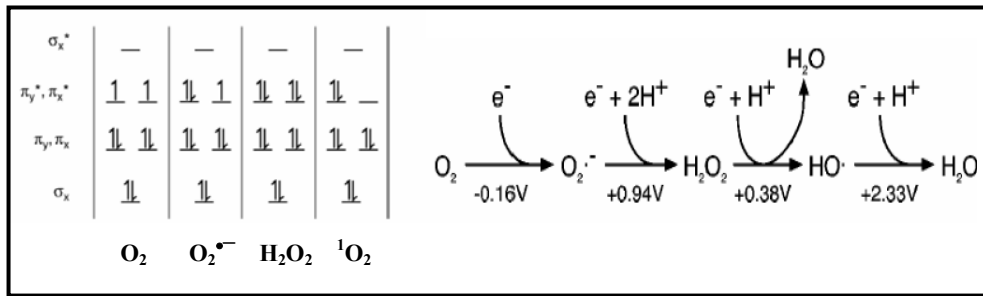
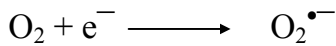


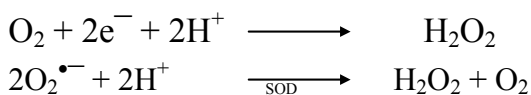
Figura 4.6. Diagrammi degli orbitali e potenziali di ossido-riduzione dell'O₂ e dei principali ROS.

Al contrario, i principali ROS sono avidi accettori di elettroni e si generano dall'O₂ prevalentemente per trasferimento elettronico. Tuttavia, l'ossigeno sigoletto (¹O₂), ROS che esiste principalmente come specie non radicalica, si forma per trasferimento energetico (o per combinazione di radicali perossilici - ROO[•]).

L'anione e/o radicale superossido (O₂^{•-}) è considerato la specie “primaria” di ROS dalla quale si originano quelle “secondarie”. E' fisiologicamente prodotto nell'organismo in seguito alla riduzione mono-elettronica dell'ossigeno molecolare:



L'O₂^{•-} non è in grado di permeare le membrane biologiche ed è caratterizzato da una limitata reattività, tanto che non rappresenta una sostanza eccessivamente dannosa per l'organismo. La sua azione tossica dipende in larga misura dalla produzione di acqua ossigenata (H₂O₂), forma protonata del dianione perossido (O₂²⁻). Si forma principalmente per riduzione bielettronica dell'ossigeno o per dismutazione di O₂^{•-} catalizzata dall'enzima superossido dismutasi (SOD):



La reattività di $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 è relativamente scarsa, L'azione dannosa per l'organismo dipende dalla loro capacità di generare il radicale idrossilico (HO^\bullet) nella reazione di Haber-Weiss (1), somma della reazione Fenton (2) e della reazione di riduzione del Fe^{3+} per opera di $O_2^{\bullet-}$ (3):



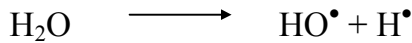
La costante di reazione della Haber-Weiss (1) in soluzione acquosa è vicina allo zero: essa quindi non può avvenire alle basse concentrazioni di $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 presenti *in vivo*. Tuttavia la presenza *in vivo* di Fe^{2+} può catalizzare la formazione di HO^\bullet .

In tale contesto è fondamentale il ruolo giocato dall'anione $O_2^{\bullet-}$. In condizioni di stress, infatti, quest'ultimo è in grado di inattivare enzimi che contengono *clusters* Ferro-Zolfo (4Fe-4S) esposti al solvente. Il ferro catalitico che presenta una carica positiva attrae elettrostaticamente $O_2^{\bullet-}$ e tale interazione determina l'ossidazione del *cluster* ed il rilascio dell'atomo di Fe^{2+} .

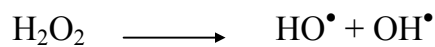
Inoltre, il carattere riducente di $O_2^{\bullet-}$ - meno abbondante rispetto ad agenti riducenti come NADPH o glutazione, ma molto più reattivo - concorre alla riduzione del Fe^{3+} a Fe^{2+} con una conseguente promozione della decomposizione di H_2O_2 ad HO^\bullet secondo la reazione di Fenton. Quest'ultima rappresenta *in vivo* la fonte principale di HO^\bullet , soprattutto nell'ambito di stati patologici come β -talassemia, emocromatosi o emodialisi, in cui la quantità di ferro libero aumenta considerevolmente (Valko e altri, 2004 e 2006).

Il radicale HO^\bullet , si può anche generare per azione fotochimica sulla acqua. Esponendo i tessuti corporei ad esempio alle radiazioni γ , la maggior parte dell'energia viene assorbita dall'acqua, dal momento che quest'ultima è la componente più abbondante dell'organismo.

Questo provoca la rottura omolitica dei legami covalenti O-H, portando alla formazione di un radicale idrogeno (H^\bullet) e uno HO^\bullet (Valko e altri, 2004):



Un terzo meccanismo di formazione di HO^\bullet , è la scissione omolitica di H_2O_2 causata dalla luce ultravioletta (Pattison e Davies, 2006):



Il radicale HO^\bullet ha un' emivita molto breve (~ 1 ns) ed è scarsamente diffusibile: reagisce infatti con qualunque componente cellulare nel sito stesso in cui viene generato. Viene considerato il più tossico fra i ROS: per via del suo elevatissimo potere ossidante e della mancanza di qualunque meccanismo endogeno di inattivazione, si ritiene infatti che la maggior parte dei danni ossidativi alle molecole biologiche possa ad esso essere attribuito, vista inoltre la relativa stabilità di $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Infine, da citare fra i ROS, vi sono anche l'ozono (O_3), agente ossidante molto più potente di O_2 ed il radicale idroperossile (HO_2^\bullet), forma protonata di $O_2^{\bullet-}$. Nonostante la sua reattività è considerato un ROS innocuo: a causa della sua pKa (~ 4.8), infatti, a pH= 7 solo lo 0,3% di $O_2^{\bullet-}$ forma HO_2^\bullet (Valko e altri, 2007).

4.4 I sistemi di difesa antiossidante

I ROS sono specie chimiche potenzialmente lesive. Per questo motivo, gli organismi viventi hanno sviluppato nel corso di millenni di evoluzione un complesso sistema di difesa antiossidante, regolarmente distribuito sia a livello extracellulare che intracellulare. Tali antiossidanti possono essere classificati secondo diversi criteri: sulla

base dell'origine, in endogeni ed esogeni; sulla base della natura chimica, in enzimatici e non; sulla base della solubilità, in liposolubili e idrosolubili.

Sulla base, invece, del meccanismo d'azione, gli antiossidanti fisiologici possono essere riuniti in 3 gruppi principali:

- antiossidanti preventivi: sono agenti che, attraverso vari meccanismi, prevengono la formazione di specie reattive. Ne sono un esempio tutte le molecole che chelano i metalli di transizione: transferrina e lattoferrina sequestrano il ferro, l'emopessina stabilizza il gruppo eme prevenendo il rilascio del ferro, ceruloplasmina ed albumina chelano il rame, l'aptoglobina sequestra l'emoglobina;
- gli *scavengers*: sono agenti che riducono la concentrazione di radicali liberi rimuovendoli dal mezzo in cui si trovano. Ne è un esempio l' α -tocoferolo (vitamina E);
- gli agenti di riparo: comprendono esclusivamente enzimi che intervengono dopo che il danno da ROS si è instaurato. Appartengono a questa categoria, per esempio, le idrolasi (glicosidasi, lipasi, proteasi), le transferasi, le polimerasi, ecc...

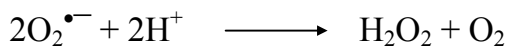
Infine, possono influenzare i summenzionati antiossidanti fisiologici gli agenti di adattamento. Questa categoria racchiude tutte quelle sostanze, tecniche o procedure attraverso le quali è possibile potenziare il sistema antiossidante fisiologico. Per esempio, un corretto esercizio fisico o l'adozione di un regime alimentare corretto ed equilibrato sono misure di per sé in grado di controllare il metabolismo ossidativo attraverso la riduzione della produzione di ROS e/o l'induzione di enzimi ad attività antiossidante.

Molto più frequente è tuttavia la classificazione sulla base della natura chimica, in antiossidanti enzimatici e non.

4.4.1 Enzimi antiossidanti

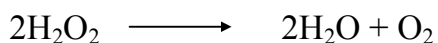
Fra gli enzimi antiossidanti vi sono:

- superossido dismutasi (SOD): è uno dei più importanti enzimi antiossidanti nei mammiferi. Nell'uomo ne sono presenti tre differenti tipi: Cu, Zn-SOD citosolica, Mn-SOD mitocondriale e SOD extracellulare, tutte coinvolte nella dismutazione di $O_2^{\bullet-}$ (Valko e altri, 2006):



L'enzima mitocondriale sembra rivestire biologicamente il ruolo più importante fra i tre, poiché topi *knok-out* per questo enzima muoiono presto dopo la nascita (Melov e altri, 1998).

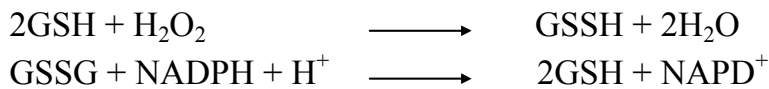
- catalasi (CAT): localizzata principalmente nei perossisomi, è tuttavia presente anche nella frazione citosolica, dove rimuove con estrema efficienza H_2O_2 . Una molecola di CAT infatti è in grado di convertire ~6 milioni di molecole di H_2O_2 in H_2O ed O_2 ogni minuto:



- glutazione perossidasi e glutazione reduttasi (GPx e GRed): esistono due forme principali di glutazione perossidasi, una selenio-indipendente (GST) e una seconda selenio-dipendente (GPx). Gli essere umani possiedono quattro differenti GPx: GPx1 è presente nei globuli rossi, nel fegato, nei reni e nei polmoni ed è localizzata nel nucleo, nel citosol e nei mitocondri; GPx2 si accumula nel citosol e nel nucleo delle cellule epiteliali del tratto gastrointestinale; GPx3 si trova nel torrente circolatorio, ma anche nel citosol (reni, polmoni, epididimo, vasi deferenti, placenta, vescicole seminali, cuore e muscoli); GPx4 è presente nel nucleo, nel citosol, nei mitocondri e legata alle membrane in una grande varietà di organi e tessuti.

La seleno-cisteina (-SeH) è un residuo essenziale nel sito attivo di questi enzimi che, attraverso la formazione di acido selenenico (-

SeOH), catalizzano, utilizzando il glutatione (GSH) come substrato, la riduzione ad H₂O di H₂O₂, potenziale substrato della reazione di Fenton. Il GSH ossidato viene poi nuovamente ridotto dall'enzima glutatione reduttasi utilizzando gli equivalenti riducenti del NADPH (Valko e altri, 2006):



- Perossiredossine (Prxs): si tratta di una famiglia di enzimi antiossidanti distribuiti in modo ubiquitario in grado di ridurre H₂O₂ (o gli idroperossidi organici) in H₂O (o nel corrispondente alcol). Nelle cellule dei mammiferi ne sono state identificate sei. Queste sono suddivise in due classi: 1-cisteina Prx e 2-cisteina Prx, sulla base del numero di residui di cisterna coinvolti nella catalisi. Questi enzimi condividono lo stesso meccanismo catalitico di base, in cui la cosiddetta cisteina perossidica nel sito attivo è ossidata ad acido sulfenico dal substrato perossido. Ciò che distingue le due classi è il successivo meccanismo di riduzione dell'acido sulfenico-cisteina. Nelle 1-cisteina Prx, quest'ultimo viene ridotto in modo diretto da donatori di equivalenti riducenti contenenti gruppi tiolici (glutatione, acido lipoico, ciclofillina, ecc.). Le 2-cisteina Prx sono invece classificate in tipiche o atipiche a seconda che lo stato ridotto venga ripristinato mediante la formazione di un disolfuro intermolecolare o intramolecolare, rispettivamente (fig. 4.7). Quest'ultimo, a sua volta, sembra essere ridotto a ditiolo principalmente dalle tioredossine. Le Prxs sono presenti sia a livello extracellulare che intracellulare (principalmente nel citosol, ma anche in perossisomi, lisosomi, reticolo endoplasmico, apparato del Golgi, mitocondri e nucleo). Questi enzimi sono espressi ad elevati livelli nelle cellule: rappresentano infatti il secondo o terzo tipo di proteina negli eritrociti e lo 0.1-0.8% delle proteine solubili nelle altre cellule (Wood e altri, 2003).

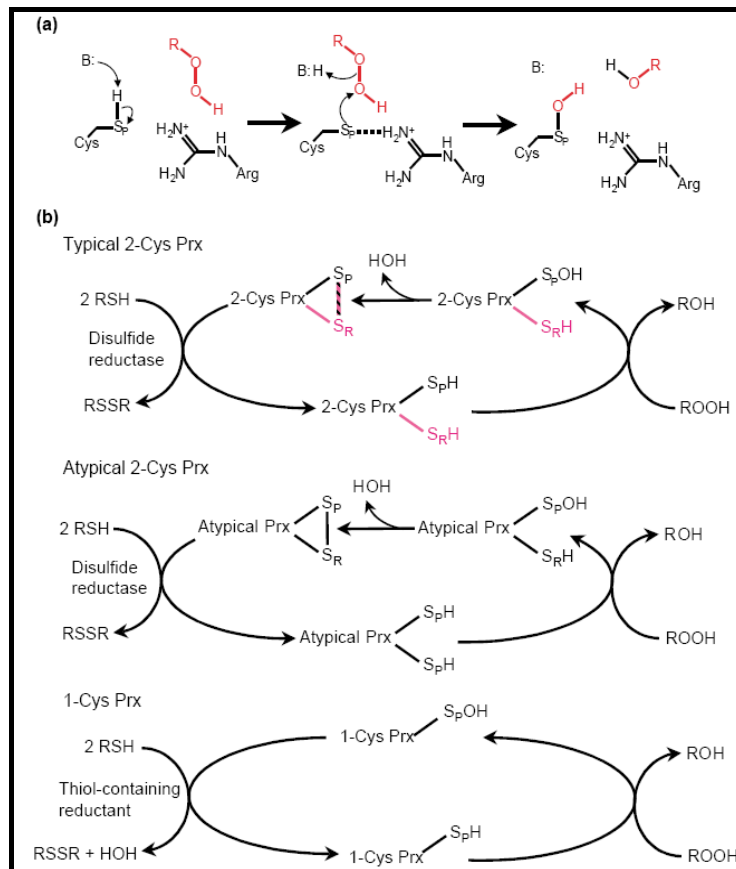


Figura 4.7. Ciclo catalitico delle Prxs.

- Tioredossine (Trxs) e tioredossina reduttasi (TR): nei mammiferi le Trxs costituiscono una famiglia di proteina di 10-20 kDa che contengono nel loro sito attivo due residui di cisteina *redox* molto conservati. Nella loro forma Trx-(SH)₂ riducono proteine dalla forma ossidata disolfuro a quella ridotta ditolo: l'enzima ridotto è successivamente ripristinato grazie alla TR mediante l'impiego degli equivalenti riducenti del NADPH (fig 4.8) Sia le Trxs che le TR sono localizzate nel citoplasma e nei mitocondri (Biaglow e Miller, 2005).

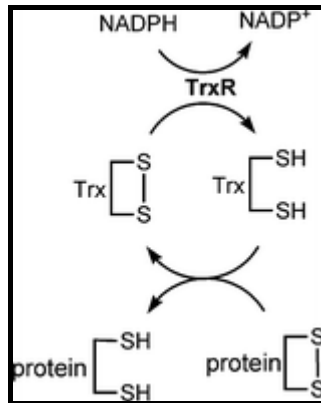


Figura 4.8. Ciclo catalitico delle Trxs e della TR.

- Glutaredossine (Grxs): catalizzano la medesima reazione delle Trxs, ma rispetto a queste ultime sono più versatili sia per quello che riguarda la scelta del substrato che il meccanismo catalitico, volto alla riduzione di disolfuri proteici. Quest'ultimo può essere ditiolico o monotiologico. Nel primo caso, l'enzima utilizza entrambi i gruppi -SH presenti nel suo sito attivo: il risultante disolfuro è poi successivamente ridotto grazie a due molecole di GSH. Il meccanismo monotiologico, invece, sembra essere più specifico per la riduzione dei disolfiri misti che si formano tra le proteine e il GSH (proteina-S-SG) e comporta il consumo di una sola molecola di GSH (fig. 4.9) (Lillig e altri, 2008).

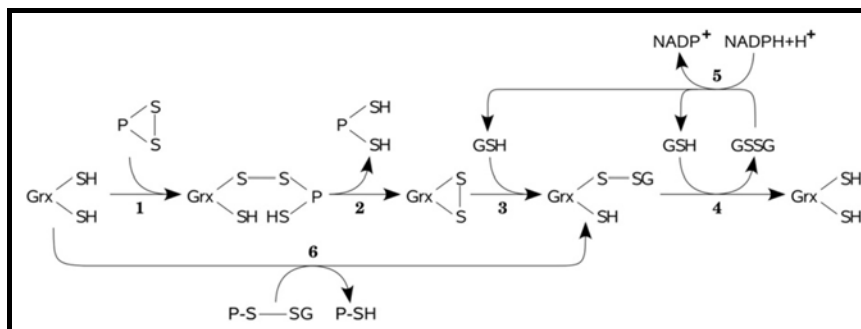


Figura 4.9. Ciclo catalitico delle Grxs. Meccanismo ditiolico: reazioni 1-4; meccanismo monotiologico: reazioni 6 e 4.

Infine, vanno citati tra gli enzimi antiossidanti la glutammato-cisteina ligasi, la glutatione sintasi (entrambe coinvolte nel metabolismo del GSH) e le metallotioneine. Queste ultime costituiscono una famiglia di almeno 10 proteine intracellulari dotate di numerosi gruppi tiolici ed in grado di legare i metalli (Karihtala e Soini, 2007).

4.4.2 Antiossidanti non enzimatici

Fra gli antiossidanti non enzimatici endogeni vanno ricordati:

- glutatione (GSH): di natura peptidica (glu-cys-gly) (fig. 4.10), è il più importante antiossidante tiolico solubile all'interno della cellula.

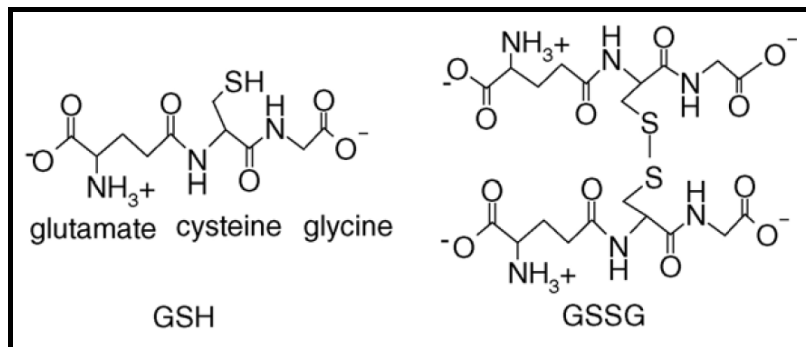
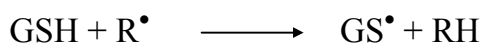


Figura 4.10. Struttura della forma ridotta (GSH) ed ossidata (GSSG) del glutatione.

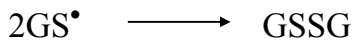
La sua concentrazione è molto elevata in comparti cellulari come il citosol (1-11 mM), i nuclei (3-15 mM), i mitocondri (5-11 mM), nei quali rappresenta il più importante antiossidante solubile.

Il suo potere antiossidante deriva dalla capacità del gruppo -SH del residuo cisteinico di donare facilmente un elettrone:

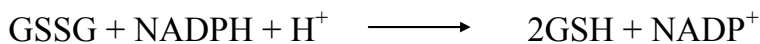


Il radicale tiile (GS[•]) ha un'emivita relativamente più lunga rispetto ai radicali che si formano in condizioni di stress ed è disattivato per

dimerizzazione, evento che porta alla formazione della forma ossidata di glutatione (GSSG):



I livelli di GSH vengono successivamente ripristinati dalla GSH reduttasi NADPH-dipendente.



Poiché la concentrazione di GSH è di 500/1000 volte più elevata rispetto alle altre proteine *redox* ed è di 10/100 volte superiore a quella di GSSG, il rapporto GSH/GSSG rappresenta una buona misura dello stress ossidativo di un organismo.

Il ruolo protettivo del GSH deriva dal suo coinvolgimento in numerosi processi cellulari (fig. 4.11). E' infatti cofattore di numerosi enzimi come la GPx e la GST. E' inoltre in grado di agire da *scavenger* nei confronti di HO^{\bullet} e $^1\text{O}_2$ e di detossificare H_2O_2 e i perossidi lipidici. Infine, ripristina la forma ridotta di importanti antiossidanti come la vitamina C ed E (Valko e altri, 2006).

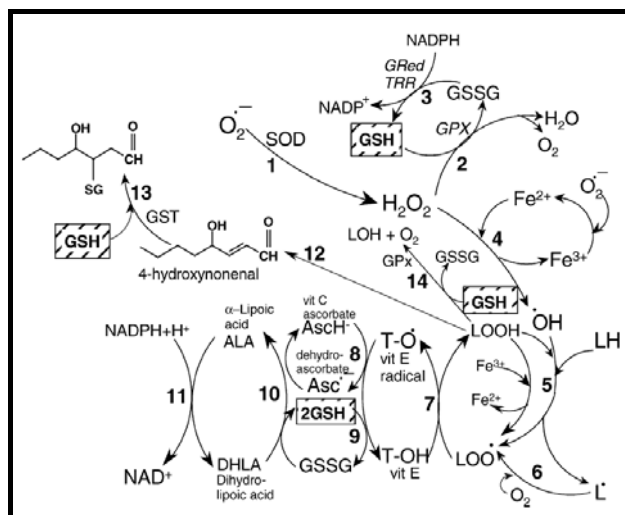


Figura 4.11. *Pathways* metabolici del GSH.

- ubiquinone (CoQ₁₀): è l'unico antiossidante lipofilo sintetizzato dall'uomo. E' localizzato in tutti i tessuti ed in ogni tipo di membrana, dove è presente principalmente nella sua forma attiva: l'ubichinolo (CoQ₁₀-H₂). Il principale meccanismo antiossidativo di quest'ultimo è la prevenzione della perossidazione lipidica: agisce sia nella fase di iniziazione che di propagazione, attraverso l'estinzione dei radicali perferrilici (Fe³⁺-O₂^{•-}) e perossilipidici, rispettivamente. Esplica inoltre tale effetto protettivo in modo indiretto, mantenendo la vitamina E ridotta (fig. 4.12).

E' inoltre coinvolto nella protezione delle proteine e del DNA (soprattutto quello mitocondriale) dal danno ossidativo ed è presente anche a livello plasmatico, dove lega e protegge le lipoproteine dall'ossidazione. La capacità della cellula di mantenere l'antiossidante nel suo stato ridotto in qualunque compartimento rappresenta un fattore di primaria importanza per la sua efficacia antiossidante. A tale scopo sono coinvolti numerosi enzimi come la lipoammide deidrogenasi, la Gred, la TR, ecc... (Bentinger e altri, 2007).

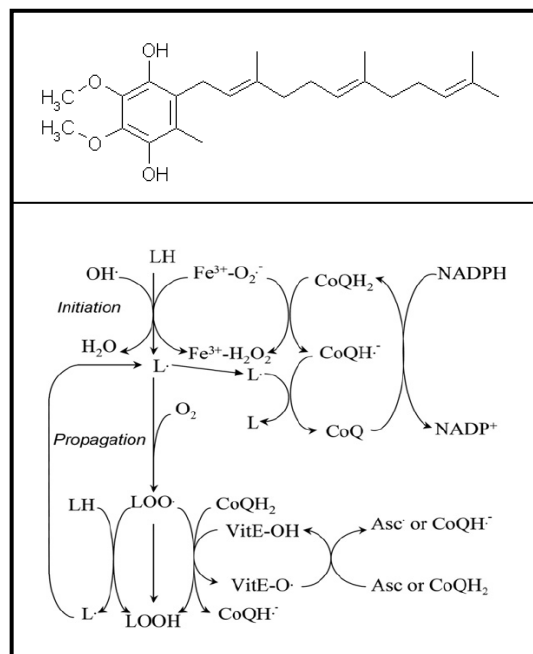


Figura 4.12. Struttura del CoQ-H₂ e sua attività antiossidante.

- acido α -lipoico (ALA): detto anche acido tiottico, è una vitamina amfipatica molto piccola che esiste in natura sotto due forme, come disolfuro ciclico e come catena aperta con il nome di acido α -lipoico e acido diidrolipoico (DHLA), rispettivamente (fig. 4.13).

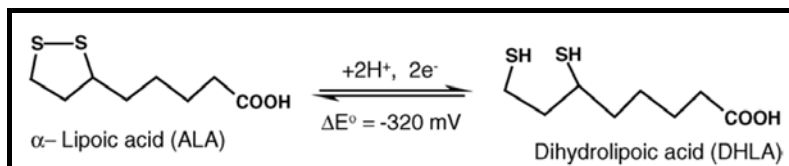


Figura 4.13. Strutture di ALA e DHLA.

ALA e DHLA esplicano la loro fortissima attività antiossidante attraverso diversi meccanismi. Sono infatti coinvolti nel *quenching* di ROS, nella rigenerazione del (GSH) e delle vitamine C ed E. Sono inoltre in grado di chelare metalli come Fe^{2+} o Cu^{2+} e di ripristinare la forma ridotta di proteine ossidate (Valko e altri, 2006).

Fra gli antiossidanti endogeni vanno inoltre menzionati: tutte le proteine plasmatiche (in particolar modo albumina, transferrina, lattoferrina, ceruloplasmina, ecc...), l'acido urico, bilirubina e biliverdina, il colesterolo, ecc..

Contribuiscono a potenziare i sistemi antiossidanti endogeni, numerose molecole esogene, principalmente di natura vegetale:

- vitamina C (ascorbato - Asc): è un antiossidante non enzimatico idrosolubile e spiccatamente acido. Presenta due gruppi idrossilici ionizzabili (AscH_2) (fig. 4.14): tuttavia, a pH fisiologico, il 99.9% della vitamina C è presente sottoforma di semideidroascorbato (AscH^-). Nell'interazione con i radicali, AscH^- dona un elettrone, generando così il radicale semideidroascorbico ($\text{Asc}^{\bullet-}$). Quest'ultimo è scarsamente reattivo ed è infatti considerato come un antiossidante terminale.

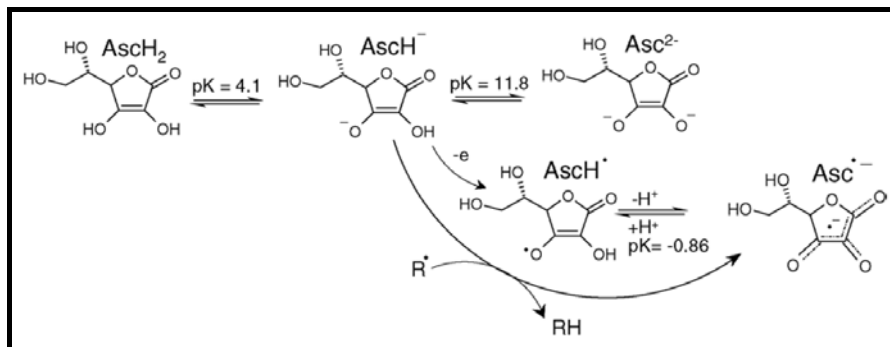


Figura 4.14. Le diverse forme di acido ascorbico (Asc) e la reazione con i radicali (R[•]).

La sua attività antiossidante si esplica principalmente in associazione ad enzimi antiossidanti, carotenoidi e vitamina E.

- α -tocoferolo (vitamina E): esistono 8 tipi di vitamina E. Fra queste, l' α -tocoferolo è la forma biologicamente più potente ed attiva. E' infatti il più importante antiossidante liposolubile utilizzato dalle cellule (fig. 4.15).

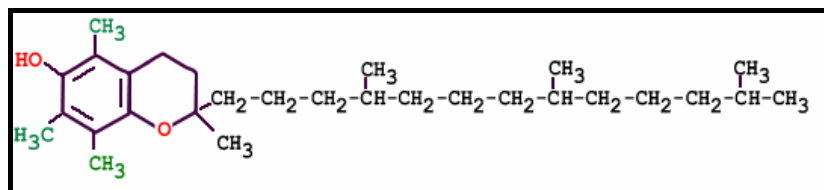


Figura 4.15. Struttura dell' α -tocoferolo.

La sua attività antiossidante è volta alla prevenzione dell'ossidazione degli acidi grassi polinsaturi, evento chiave nello sviluppo della perossidazione lipidica. La vitamina E è in grado di bloccare questo fenomeno donando l'elettrone del suo gruppo idrossilico ai radicali perossilipidici, rendendoli in tal modo meno reattivi e bloccando di fatto la loro perossidazione. Tale reazione *redox* trasforma l' α -tocoferolo in un radicale α -tocoferossilico che è piuttosto stabile, grazie allo sviluppo di fenomeni di risonanza, e che può reagire con la vitamina C, il glutatione o la vitamina Q (Q10) per riformare l' α -tocoferolo.

- carotenoidi: sono una classe di pigmenti naturali liposolubili. Se ne conoscono circa 600 e si trovano principalmente nelle piante (e negli organismi fotosintetici). Conseguentemente, vengono incorporati dagli animali solo attraverso la dieta. Vengono suddivisi in xantofille e caroteni: entrambe le classi di pigmenti condividono un tipico schema strutturale responsabile della loro attività antiossidante (fig. 4.16).

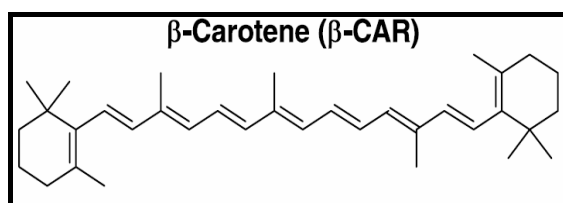


Figura 4.16 Struttura di un carotenoide, il beta-carotene.

In generale, l'interazione dei carotenoidi con i radicali prevede tre meccanismi principali: l'addizione del radicale, la sottrazione di idrogeno ed il trasferimento elettronico ($CAR + R^\bullet \longrightarrow RCAR^\bullet$; $CAR + R^\bullet \longrightarrow CAR^\bullet + RH$; $CAR + R^\bullet \longrightarrow CAR^{\bullet+} + R^-$, rispettivamente).

La particolare disposizione alternata di singoli e doppi legami permette di trasferire l'eccesso di energia contenuto nei ROS alla struttura elettrone-ricca di queste molecole, nella quale la carica degli elettroni viene a trovarsi delocalizzata (Valko e altri, 2006).

- polifenoli: sono una famiglia numerosa ed eterogenea di metaboliti secondari delle cellule vegetali con una struttura chimica comune: sono derivati del benzene con uno o più gruppi idrossilici associati all'anello (fig. 4.17). Questa struttura consente a tali composti di funzionare attivamente da: *scavenger* per stabilizzare i radicali liberi, agenti riducenti, chelanti di metalli e *quencher* della formazione di ossigeno singoletto.

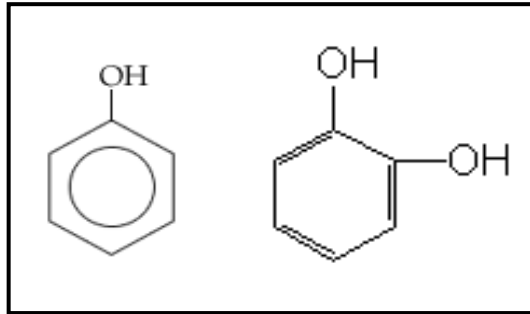
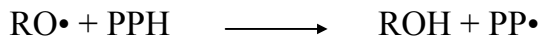


Figura 4.17. Fenoli semplici.

Essi infatti sono in grado di combattere i ROS bloccando la perossidazione lipidica, l'ossidazione delle lipoproteine plasmatiche e l'ossidazione di micro- e macro- molecole mediante la rapida donazione di un idrogeno ai radicali:



Sono inoltre dotati di attività antiossidante indiretta (Carratù e Sanzini, 2005)

- glucosinolati: sono un gruppo di oltre 130 differenti composti distribuiti principalmente nella famiglia delle *Brassicaceae*. Gli effetti antiossidanti mediati da queste sostanze sono ascritti principalmente ai loro prodotti di idrolisi: gli isotiocianati (fig. 4.18).

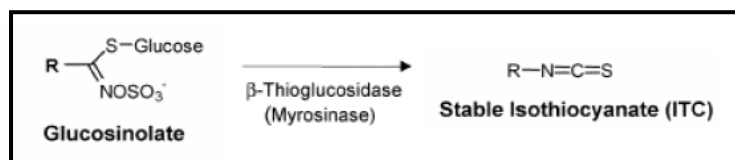


Figura 4.18. Glucosinolati ed isotiocianati.

Questi ultimi agiscono soprattutto da antiossidanti indiretti. Attraverso il fattore trascrizionale Nrf2 sono infatti in grado di indurre numerosissimi enzimi coinvolti nel controllo dello stato *redox* della cellula. Fra questi: DT-diaforasi, aldochetoreduccasi, γ -glutamilsteinsintasi (che aumenta i livelli di GSH), tioredossina reductasi, eme-ossigenasi, ecc... (Zhang, 2004).

4.5 Danno ossidativo e cancerogenesi

L'esposizione ad un eccesso di ROS per via di un aumento della loro produzione e/o una riduzione del loro smaltimento predispone cellule e tessuti a danno ossidativo.

I tumori sono notoriamente esposti ad un eccesso di ROS e, conseguentemente, ad una condizione di stress ossidativo continuo. Il persistente stato infiammatorio, la neoangiogenesi indotta dalla massa cancerosa ipossica (per via di una vascolatura spesso inadeguata e difettosa) e la successiva riperfusione, l'aumento del metabolismo glicolitico associati ai tumori rappresentano le tre principali cause di incremento di ROS nelle cellule neoplastiche rispetto ai tessuti sani circostanti (Karihtala e Soini, 2007).

Il coinvolgimento dei ROS nel processo di cancerogenesi è testimoniato dall'abbondante presenza di alterazioni ossidative (genotossiche ed epigenetiche) nei tessuti tumorali (Loft e Poulsen, 1996).

Vi è tuttavia da precisare che, contrariamente a quanto si possa pensare, livelli di ROS da bassi a moderati sono coinvolti nel processo di iniziazione, promozione e progressione tumorale, mentre una condizione di elevato stress ossidativo induce apoptosi o necrosi ed è, quindi, citotossica (fig. 4.18) (Valko e altri, 2006).

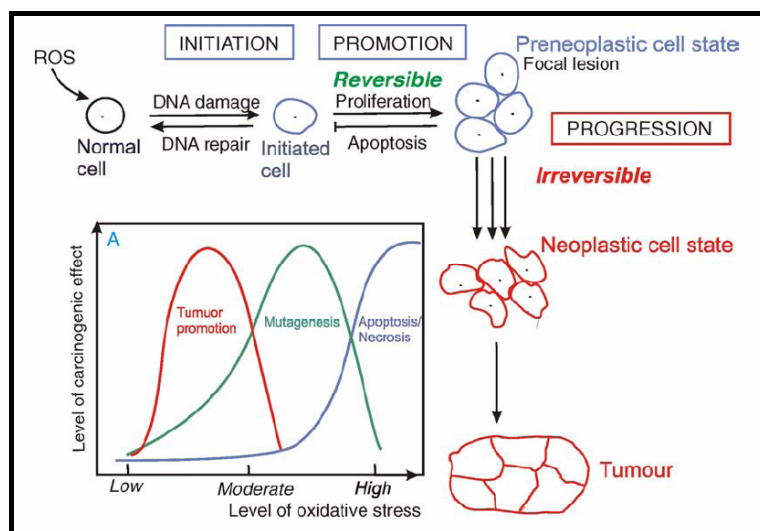


Figura 4.19. Rapporto tra i livelli di ROS e le tre fasi del processo di cancerogenesi chimica.

4.5.1 Il danno genotossico

I ROS possono attaccare qualunque struttura cellulare: tuttavia, ai fini del processo cancerogenetico, il DNA nucleare rappresenta sicuramente il bersaglio più importante.

Si stima che la cellula sia colpita ogni giorno da circa 10^5 lesioni ossidative da parte di HO^\bullet e altri ROS. L'attacco al DNA può determinare rotture a singolo o doppio filamento, modificazioni dello scheletro di deossiribosio, *cross-links* DNA-DNA o DNA-proteina, induzione di siti apurinici o apirimidinici, danni ossidativi alle basi azotate. Tali eventi sono causalmente riconducibili a *frame shifts*, riarrangiamento cromosomico, scambio di cromatidi fratelli, arresto o induzione della trascrizione, errori replicativi ed instabilità genomica, stimolazione di cascate di trasduzione del segnale, tutti eventi coinvolti nel processo di cancerogenesi (Valko e altri, 2006). In particolare, la capacità mutazionale del danno ossidativo alle basi azotate, studiata attraverso batteriofagi e DNA plasmidico, sembra essere legata principalmente a modificazioni delle coppie CG, mentre quelle che colpiscono AT raramente portano a variazioni genetiche.

Inoltre, le modificazioni del DNA indotte sembrano essere principalmente sostituzioni di basi, mentre delezioni o inserzioni sono meno frequenti.

In tale contesto, per via della sua elevata reattività, il radicale maggiormente coinvolto è HO[•].

Fra i suoi prodotti di ossidazione purinici, l'8-idrossi-2-desossiguanosina (8-OH-dG) e il suo tautomero chetonico 8-oxo-2-deossiguanosina (8-oxo-dG) sono i più studiati. Si tratta di lesioni mutagene in cellule batteriche e di mammifero poiché inducono transversioni GC→TA, rinvenute *in vivo* in geni oncosoppressori come p53 oppure oncogeni come Ras (Loft e Poulsen, 1996). Analogamente è in grado di attaccare la base A generando 8-OH-dA, 8-oxo-dA, fapy-adenina, ecc..in grado di indurre mutazioni.

Inoltre, si addiziona anche alle pirimidine formando gli addotti 5-OH T, 6-OH C, 5-OH-metil-uracile, citosina e timina glicole, 5-formil uracile, ecc..., anch'essi mutageni (Klaunig e Kamendulis, 2004).

Oltre al danneggiamento del DNA nucleare, sembra ormai evidente che anche il danno ossidativo del DNA mitocondriale (mDNA) sia coinvolto nel processo di cancerogenesi.

In generale, il genoma mitocondriale sembra essere molto più suscettibile al danno ossidativo rispetto a quello nucleare. Non è infatti protetto dagli istoni, ha una capacità riparativa più limitata e si trova in prossimità dei complessi proteici delle fosforilazione ossidativa. In aggiunta, le cellule cancerose posseggono un metabolismo glicolitico accelerato rispetto a quelle sane: il conseguente *burst* respiratorio è stato quindi associato ad un aumento della frequenza di mutazione. Benché non sia ancora chiaro il peso di tali alterazione nella eziologia neoplastica, alterata espressione e mutazioni nei geni che codificano per i Complessi I, II, III e IV della catena respiratoria e nelle regioni ipervariabili dell'mDNA sono stati identificati in numerosi cancri umani. Inoltre, H₂O₂ e altri ROS sembrano essere implicati nell'attivazione dei geni nucleari coinvolti nella biogenesi mitocondriale, nella trascrizione e replicazione

dell'mDNA. Infine, si ritiene che l'inserzione di frammenti di quest'ultimo nel genoma nucleare, rinvenuta in cellule HeLa, possa essere un possibile meccanismo di attivazione di oncogeni (Valko e altri, 2007).

4.5.2 Il danno epigenetico

I meccanismi di danneggiamento cellulare epigenetico da parte dei ROS sono innumerevoli e, al pari delle lesioni ossidative al DNA, giocano un ruolo di primaria importanza nel processo neoplastico. I *targets* principali sono le proteine, i lipidi, le giunzioni intercellulari, l'alterazione del pH, alcuni canali ionici, la metilazione del DNA, numerosissime cascate di trasduzione del segnale coinvolte nella regolazione della crescita cellulare, nell'espressione genica, nelle caratteristiche fenotipiche cellulari, ecc...

La catena laterale di ogni residuo amminoacidico è suscettibile al danno ossidativo, soprattutto quello indotto dalla presenza di metalli *redox*. I danni più frequenti comprendono la scissione ossidativa della catena peptidica, la perdita di residui di istidina, *cross-links* tirosina-tirosina, l'introduzione di gruppi carbonili, la formazione di radicali proteici e l'ossidazione dei gruppi tiolici (Valko e altri, 2006). Tali alterazioni proteiche possono portare ad alterazioni funzionali, alla formazione di *linkages* inter- ed intra-proteici, a cambiamenti conformazionali con aumento dell'idrofobicità e successiva denaturazione, aggregazione e precipitazione proteica oppure alla degradazione proteasomica. Benché si tratti di danni riparabili, è facile intuire come possano alterare la normale fisiologia cellulare e favorire il fenotipo canceroso se le proteine coinvolte sono, per esempio, istoni, enzimi di riparo del DNA, DNA polimerasi (Goetz e Luch, 2008), le caspasi o p53, ecc.... (Pervaiz e Clement, 2007; Halliwell, 2007).

Per quello che riguarda i lipidi, i ROS agiscono determinando la loro perossidazione (fig. 4.20). Il danno inizia quando il radicale HO[•]

sottrae un atomo di idrogeno ad uno degli atomi di carbonio della catena degli acidi grassi insaturi generando un radicale lipidico centrato sul carbonio. Segue una redistribuzione dei doppi legami del radicale che porta alla formazione del diene coniugato, il quale, in presenza di ossigeno, si trasforma in radicale perossile. Quest'ultimo è instabile e può non solo reagire con un atomo di idrogeno di un vicino acido grasso trasformandosi in idroperossido, ma anche andare incontro, per la sua peculiare struttura, a una serie di riarrangiamenti (principalmente ciclizzazioni) oppure reazioni (con i metalli) che ne mediano la degradazione (fig 4.20).

Fra i principali prodotti di degradazione a carattere aldeidico vi sono la malonildialdeide (MDA) e il 4-idrossinonenale (HNE).

La prima è mutagena in cellule batteriche, di mammifero e nel test del *mouse lymphoma* e cancerogena nel ratto trattato cronicamente. E' in grado di formare addotti con dA, dC e dG: quest'ultimo è mutageno in *E. Coli*. HNE è invece debolmente mutageno, ma sembra essere il principale composto tossico derivante dalla degradazione lipidica. E' in grado di alterare numerose cascate di trasduzione del segnale (con conseguente alterazione delle caratteristiche fenotipiche cellulari) e, nella forma di epossido, di reagire con dA, dC e dG formando eteno-addotti mutageni e genotossici.

Propano-addotti sono invece formati dalla reazione del DNA con acroleina e crotonaldeide, composti derivati dalla processo di perossidazione lipidica e mutageni in cellule batteriche e di mammifero (Valko e altri, 2006). La perossidazione lipidica indotta dai ROS, quindi, alimenta non solo il danno epigenetico, ma anche quello genotossico.

Le *gap junctions* sono un ulteriore bersaglio dei ROS. Questa via di comunicazione media il passaggio di fattori di crescita in grado di regolare positivamente o negativamente la proliferazione cellulare.

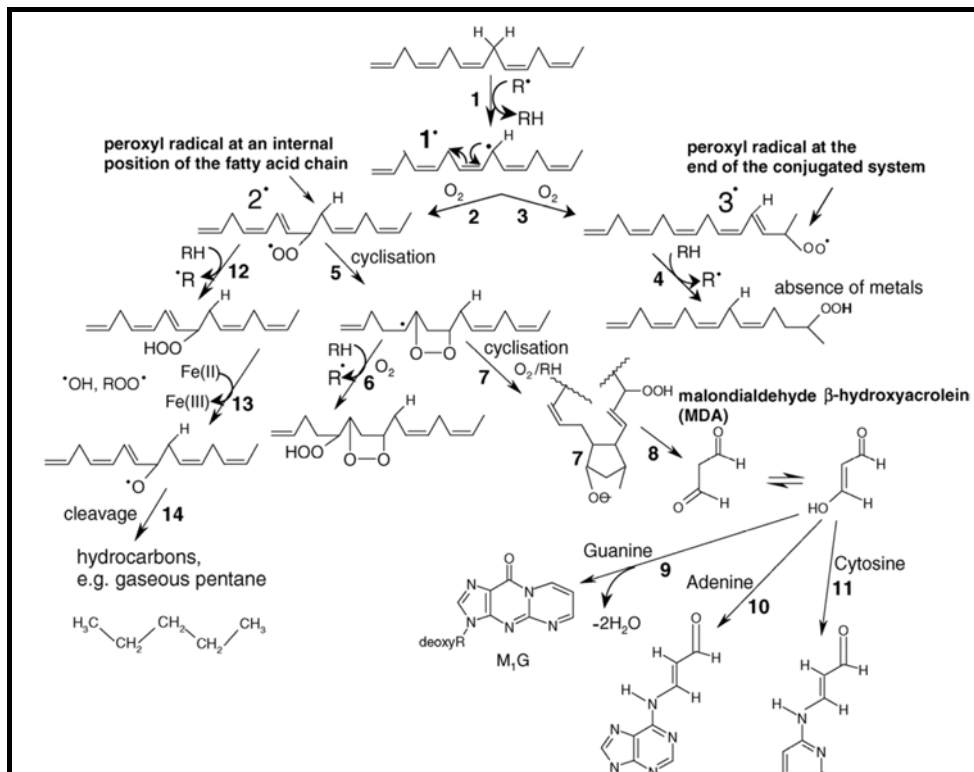


Figura 4.20. Reazione di perossidazione lipidica.

H_2O_2 inibisce la comunicazione cellulare mediata da *gap junctions* in cellule epiteliali di ratto WB-F344, favorendo l'espansione clonale e, quindi, la fase di promozione tumorale attraverso l'emarginazione delle cellule preneoplastiche dal controllo offerto dai fattori di crescita delle circostanti cellule sane (Upham e altri, 1997).

Per quello che riguarda il pH, vi è da precisare che i ROS possono avere su di esso un effetto antitetico. Un *milieu* citosolico alcalino è una caratteristica costante delle cellule tumorali (7.12-7.65 contro 6.99-7.20 nei tessuti sani). In tale contesto gioca un ruolo fondamentale il trasportatore Na^+/H^+ (NHE1), la cui attività aumenta con l'aggressività tumorale. $\text{O}_2^{\bullet-}$ è in grado di stimolare il promotore e l'espressione genica di quest'ultimo. Favorendo l'alcalinizzazione del citosol grazie all'aumento dell'efflusso di H^+ , $\text{O}_2^{\bullet-}$ promuove la proliferazione delle cellule tumorali poiché il pH basico inibisce

l'attivazione delle caspasi. Al contrario, H_2O_2 ha un effetto del tutto opposto su NHE1 e la conseguente acidificazione del pH intracellulare induce la morte cellulare programmata. In tale contesto è stato quindi attribuito a $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 il ruolo di *onco-ROS* e *tumor suppressor-ROS*, rispettivamente. Oltre ad NHE1, i ROS influenzano positivamente l'attività della pompa di membrana Na^+/Ca^{2+} e del recettore per l'inositolo trifosfato sulla membrana del REL (Pervaiz e Clement, 2007).

Un'altra frequente caratteristica delle cellule neoplastiche è l'alterazione del *pattern* di metilazione del DNA. Sebbene nei tumori siano frequenti stati di ipermetilazioni del GpC *islands* di numerosi geni oncosoppressori (che vengono così silenziati), lo stress ossidativo agisce principalmente determinando ipometilazione. L'ingombro sterico offerto dal frequente danno ossidativo alle G impedisce infatti alle metil-transferasi di avvicinare le adiacenti C nelle GpC *islands*: conseguentemente, viene favorito il processo tumorale promuovendo l'espressione di oncogeni (Franco e altri, 2008; Klaunig e Kamendulis, 2004).

Il coinvolgimento dei ROS nelle cascate di trasduzione del segnale che possono favorire la cancerogenesi è davvero trasversale.

In tale contesto, gioca un ruolo fondamentale la loro capacità di avviare la cascata delle MAPK attraverso l'attivazione della PKC e l'inattivazione delle proteine tirosina fosfatasi (PTP).

Conseguentemente, numerosi fattori trascrizionali vengono attivati come ad esempio Smad, AP-1, NF-kB, Ets, Snail, ecc...Ciascuno di essi, regolando specifici geni *target* come le E-caderine, collagenasi, integrine o biglicano, promuove la transizione epitelio-mesenchimale e favorisce, quindi, la migrazione e l'invasività delle cellule tumorali (fig. 4.21).

In aggiunta, i ROS inducono anche l'espressione di HIF1, del *vascular endothelial growth factor* (VEGF) e il rimodellamento del citoscheletro, eventi fondamentali per l'angiogenesi tumorale e la migrazione delle cellule cancerose, rispettivamente (Wu, 2006).

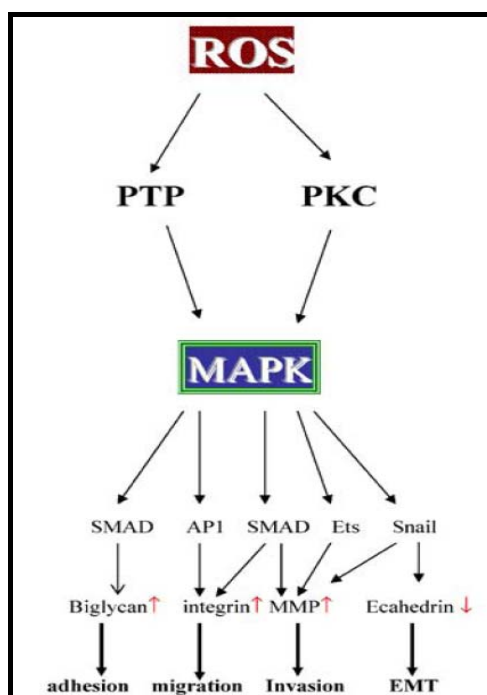


Figura 4.21. ROS e cascate di trasduzione del segnale che promuovono la cancerogenesi; MMP = collagenasi; EMT = transizione epitelio-mesenchimale.

Fra i geni regolati vi sono anche quelli che codificano per l'interleuchina-2 e il suo recettore: con questo meccanismo i ROS aumentano l'attivazione delle cellule T e potenziano, quindi, la risposta immunitaria e infiammatoria (Pervaiz e Clement, 2007).

Altri meccanismi che favoriscono la progressione tumorale sono il blocco dell'*anoikia* - un tipo di morte cellulare indotta dalla mancanza di adesione all'endotelio o epitelio di appartenenza - e l'aumento della permeabilità vascolare (Halliwell, 2007).

Con i meccanismi menzionati, i ROS partecipano non solo alla fase di progressione, ma anche a quella di promozione tumorale.

API infatti, attraverso l'induzione della trascrizione del gene della ciclica D1 e la regolazione negativa dell'apoptosi, promuove la proliferazione cellulare. Le medesime considerazioni valgono per NF- κ B che, infatti, oltre a regolare la trasformazione tumorale e

l'angiogenesi, promuove la proliferazione cellulare, principalmente inibendo l'apoptosi (Klaunig e Kamendulis, 2004).

La promozione tumorale sembra inoltre essere stimolata dall'alterazione dell'attività di proteine chinasi (oltre alla già citata PKC), dalla stimolazione dell'attività delle tiroxina-chinasi e dall'inattivazione ossidativa delle fosfatasi (Pervaiz e Clement, 2007). In quest'ultimo contesto, particolarmente coinvolta è la proteina fosfatasi PTEN. L'inattivazione di quest'ultima, infatti, amplificando il segnale della chinasi Akt, promuove la proliferazione cellulare e la soppressione dell'apoptosi (fig. 4.22) (Halliwell, 2007).

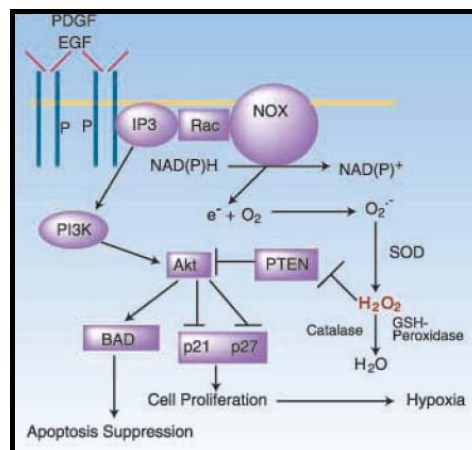


Figura 4.22. Blocco della fosfatasi PTEN da parte dei ROS.

Infine, altre cascate di trasduzione del segnale che, una volta intercettate dai ROS, promuovono la proliferazione cellulare e/o sopprimono l'apoptosi sono quelle dipendenti dal cAMP e dal Ca^{2+} , ione fortemente mobilitato dai depositi intracellulari in seguito a stress ossidativo (Klaunig e Kamendulis, 2004).

4.6 Le specie reattive dell'azoto (RNS)

Le specie reattive centrate sull'azoto di maggior rilevanza biomedica comprendono varietà sia radicaliche che non radicaliche. Fra le prime

sono da citare l'ossido nitrico (NO^\bullet) e il biossido nitrico (NO_2^\bullet); secondariamente vi sono l'acido nitroso (HNO_2), il tetrossido di azoto (N_2O_4), triossido nitrico (N_2O_3), il perossinitrito (ONOO^-), l'acido perossinitroso (ONOOH), il catione nitronio (NO^{2+}). Come i ROS, anche i RNS giocano ruoli fisiologici di estrema importanza (soprattutto NO^\bullet). Tuttavia, se prodotti in eccesso, possono dare un tipo di stress definito nitrosativo.

NO^\bullet è considerato il RNS primario. Viene prodotto insieme alla L-citrullina, a partire dall'amminoacido L-arginina, in una reazione che richiede O_2 , NADPH, il cofattore tetraidrobiopterina ed è catalizzata dagli enzimi ossido nitrico sintetasi (NOS) (fig. 4.23).

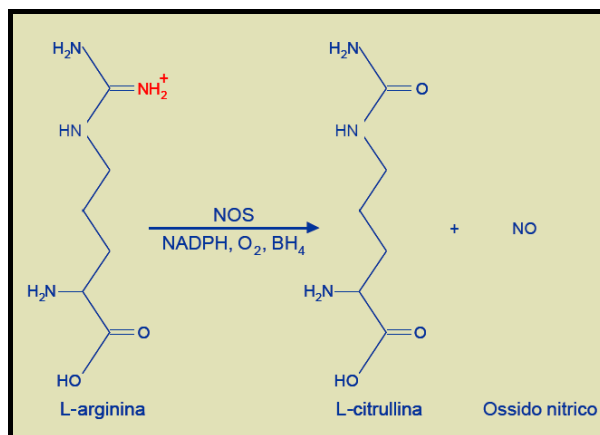


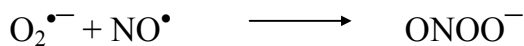
Figura 4.23. Sintesi dell' NO^\bullet ; BH_4 = tetraidrobiopterina.

E' molto stabile a concentrazioni di O_2 molto basse ed è solubile sia in ambiente lipidico che acquoso, dove ha un'emivita piuttosto ridotta.

Anche NO^\bullet è coinvolto nel processo di cancerogenesi sia dal punto di vista genotossico che epigenetico. In molti tumori umani, infatti, è stata trovata un'elevata espressione di NOS. Il principale danno al DNA nucleare è rappresentato dalla generazione di lesioni precancerose attraverso la deaminazione dei nucleotidi. E' inoltre coinvolto nello stato di infiammazione cronica, nel processo di angiogenesi e metastasi che accompagnano i tumori. NO^\bullet ha una

grande affinità per il ferro e riesce, quindi, ad indurre il rilascio da proteine come la ferritina: partecipa in questo modo alla formazione dei ROS attraverso le reazioni di Fenton e Haber-Weiss e alla perossidazione lipidica. Attraverso la sua affinità con i gruppi tiolici, contenuti in proteasi come calpaine e caspasi, interferisce inoltre con il processo di apoptosi attraverso la formazione di S-nitrosotioili (peptide-SNO). Altre proteine inattivate sono i complessi I e II della catena respiratoria, l'aconitasi e la ribonucleotide reduttasi (Goetz e Luch, 2008).

In presenza di $O_2^{\bullet-}$, NO^{\bullet} reagisce generando $ONOO^-$, un potente ossidante la cui reattività può essere paragonata a quella di HO^{\bullet} :



La costante di velocità di questa reazione è estremamente elevata: NO^{\bullet} reagisce quindi raramente in modo diretto con le macromolecole e la sua tossicità è legata principalmente all'attività di $ONOO^-$.

Quest'ultimo è in grado di indurre rottura della catena del DNA e mutazioni attraverso la formazione di 8-OH-dG e 8-nitroguanina.

Dal punto di vista epigenetico, i suoi bersagli principali sono i metalli di transizione, i gruppi tiolici e i residui tirosinici. La nitratura di questi ultimi può alterare il *pattern* di fosforilazione e, conseguentemente, l'attività di proteine come p53. E' inoltre coinvolto nella perossidazione lipidica e nell'alterazione della catena respiratoria mitocondriale (Goetz e Luch, 2008; Karihtala e Soini, 2007).

CAPITOLO 5

I VEGETALI ED IL CANCRO

5.1 Attività chemiopreventiva della cipolla (*Allium cepa*)

Gli effetti benefici associati all'utilizzo dei vegetali del genere *Allium* sono noti fin dall'antichità. Infatti, il loro impiego nella medicina tradizionale risale addirittura al *Codex Ebers* (1151 a.C.), un papiro medico egiziano che riporta alcune centinaia di formule terapeutiche a base di aglio (*A. sativum*) e cipolla (*A. cepa*) per la cura di mal di testa, affezioni cardiache, punture di insetti, ecc...

Attualmente, oltre alla proprietà anti-microbica, -micotica e -parassitaria, ipocolesterolizzante, ipotensiva ed antiaggregante piastrinica di tali vegetali (Ali e altri, 2000, Rose e altri, 2005), ha richiamato particolare attenzione la capacità di proteggere dal cancro, proprietà ascritte ai numerosi *phytochemicals* in essi contenuti.

5.1.1 La cipolla ed i composti fitochimici

I composti fitochimici che caratterizzano il genere *Allium* vengono suddivisi in due categorie principali: composti volatili e non volatili.

Questi ultimi comprendono saponine e flavonoidi.

Le saponine sono formate dall'unione di residui zuccherini (come glucosio, fruttosio, galattosio, arabinosio od altri, presenti in numero variabile da una a sei unità) con una molecola non zuccherina detta aglicone o sapogenina a nucleo steroideo o triterpenico. Dalla cipolla bianca, utilizzata per la realizzazione del presente lavoro, sono state isolate principalmente la sapogenina cepagenina e le saponine alliospiroside A-D ed alliofuroside A (fig. 5.1). Sono stati inoltre caratterizzati, da altri tipi di cipolla, le sapogenine sitosterolo, gitogenina, acido oleanoico, amirina, diosgenina, β -clorogenina e le saponine tropesoide (A1/A2, B1/B2) ed ascalonicoside (A17A2, B).

Numerose sono le evidenze sperimentali a favore dell'attività antimicotica, citotossica, antitumorale, antispasmodica e anticolesterolemia di queste molecole estratte dall'aglio o dalla cipolla (Lanzotti, 2006).

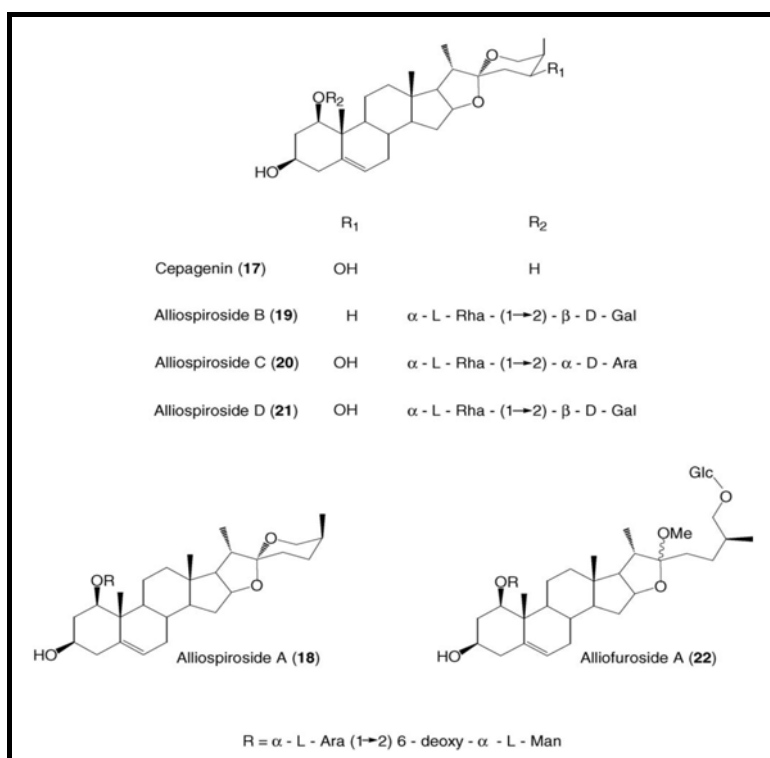


Figura 5.1. Saponine e saponine isolate dalla cipolla bianca.

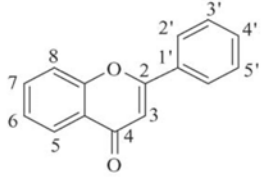
Per quello che riguarda la componente fenolica, è stato stimato che le foglie modificate della cipolla contengano una delle più elevate quantità di flavonoidi nel mondo vegetale, in particolare antocianine e flavonoli.

Sono stati identificati almeno 25 differenti tipi di antocianine, responsabili della caratteristica colorazione rossa/viola di alcune varietà. Nella cipolla rossa ammontano circa al 10% del contenuto totale di flavonoidi e sono rappresentate principalmente da glucosidi cianidinici acilati con acido malonico o non acilati (fig. 5.2).

I flavonoli sono responsabili della colorazione giallognola e dorata delle foglie modificate e della buccia delle cipolle, rispettivamente. *A. cepa* è il vegetale con il più alto contenuto del flavonolo quercetina, presente principalmente sotto forma di monoglucoside (4'-*O*-monoglucoside) o di glucoside (3, 4'-*O*-diglucoside). Questi ultimi rappresentano circa il 93% del contenuto totale di flavonoli. Vi è tuttavia da precisare che nella cipolla bianca la quercetina e i suoi glucosidi, pur essendo i flavonoli più rappresentativi, sono presenti in quantità del tutto trascurabili rispetto alla cipolla rossa o dorata. Fra i flavonoli minori sono da citare kaempferolo, isoramnetina e luteolina (Slimestad e altri, 2007).

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
cyanidin 3-glucoside						
cyanidin 3-(3''-glucosylglucoside) = cyanidin 3-laminariobios						
cyanidin 3-(3''-malonylglucoside)						
cyanidin 3-(6''-malonylglucoside)						
cyanidin 3-(3''-glucosyl-6''-malonylglucoside)						
cyanidin 3-(3'',6''-dimalonylglucoside)						
cyanidin 3-(dimalonyl)laminariobioside						
cyanidin 3-(3''-acetylglucoside)						
cyanidin 3-(malonyl)(acetyl)glucoside						
cyanidin 3,5-diglucoside	26	H	H	H	glc	H
cyanidin 3-(malonyl)-glucoside-5-glucoside	27	H	H	H	lam	H
cyanidin 4'-glucoside	28	H	H	H	3''-malglc	H
cyanidin 3,4'-diglucoside	29	H	H	H	6''-malglc	H
cyanidin 3-(3''-glucosyl-6''-malonylglucoside)-4'-glucoside	30	H	H	H	6''-mallam	H
cyanidin 7-(3''-glucosyl-6''-malonylglucoside)-4'-glucoside	31	H	H	H	3'',6''-di-malglc	H
peonidin 3-glucoside	32	H	H	H	di-mallam	H
peonidin 3-(6''-malonylglucoside)	33	H	H	H	3''-acglc	H
peonidin 3,5-diglucoside	34	H	H	H	mal-acglc	H
peonidin 3-(6''-malonylglucoside)-5-glucoside	35	H	H	H	glc	glc
delphinidin 3-glucoside	36	H	H	H	malglc	glc
delphinidin 3-glucosylglucoside	37	H	glc	H	H	H
petunidin glucoside	38	H	glc	H	glc	H
petunidin (glucosylglucoside)	39	H	glc	H	6''-mallam	H
5-carboxypyranocyanidin 3-glucoside	40	H	glc	H	H	6''-mallam
5-carboxypyranocyanidin 3-(6''-malonylglucoside)	41	CH ₃	H	H	glc	H
	42	CH ₃	H	H	6''-malglc	H
	43	CH ₃	H	H	glc	glc
	44	CH ₃	H	H	6''-malglc	glc
	45	H	H	OH	glc	H
	46	H	H	OH	gleglc	H
	47	CH ₃	H	OH	glc	H
	48	CH ₃	H	OH	gleglc	H

Figura 5.2. Tipi e strutture chimiche delle principali antocianine presenti nel bulbo della cipolla; glc = glucosio, lam = laminariobioside (3-glucosilglucoside), mal = malonil, ac = acetoil.



Compound	Subst.	Content in onion (mg/Kg)
Apigenin (52)	4', 5, 7 (OH) ₃	n.d.
Isorhamnetin (53)	3, 4', 5 (OH) ₃ ; 7 (OCH ₃)	m.a.
Kaempferol (54)	3, 4', 5, 7 (OH) ₄	832
Luteolin (55)	3', 4', 5, 7 (OH) ₄	391
Quercetin (56)	3, 3', 4', 5, 7 (OH) ₅	1497
Myricetin (57)	3, 3', 4', 5', 5, 7 (OH) ₆	n.d.

Figura 5.3. Struttura e contenuto dei principali flavonoidi presenti nella cipolla.

Fra i composti organici volatili vi sono invece quelli contenenti selenio oppure zolfo.

Fra le tante molecole identificate (fig. 5.4), i due principali composti contenenti selenio presenti nei vegetali del genere *Allium* sono Se-metil selenocisteina e γ -glutamyl-Se-metil selenocisteina.

Selenate	SeO_4^{2-}
Dimethylselenide	$\text{CH}_3\text{-Se-CH}_3$
Methaneseleninic acid	$\text{CH}_3\text{-SeO}_2\text{H}$
Se-methionine	$\text{H}_2\text{N-CH(CO}_2\text{H)-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Se-CH}_3$
Se-cysteine	$\text{H}_2\text{N-CH(CO}_2\text{H)-CH}_2\text{-SeH}$
Se-methyl selenocysteine	$\text{H}_2\text{N-CH(CO}_2\text{H)-CH}_2\text{-Se-CH}_3$
Se-propyl selenocysteine	$\text{H}_2\text{N-CH(CO}_2\text{H)-CH}_2\text{-Se-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$
Se-cystathionine	$\text{H}_2\text{N-CH(CO}_2\text{H)-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Se-Se-CH}_2\text{-CH(CO}_2\text{H)-NH}_2$
γ -Glutamyl-Se-methyl selenocysteine	$\text{H}_2\text{N-CH(CO}_2\text{H)-(CH}_2\text{)}_2\text{-CO-NH-CH(CO}_2\text{H)-CH}_2\text{-Se-CH}_3$
γ -Glutamyl-Se-methionine	$\text{H}_2\text{N-CH(CO}_2\text{H)-(CH}_2\text{)}_2\text{-CO-NH-CH(CO}_2\text{H)-(CH}_2\text{)}_2\text{-Se-CH}_3$

Figura 5.4. Composti contenenti selenio nella cipolla e nell'aglio.

Nonostante tali composti fitochimici posseggano diverse attività anti-cancro (Arnault e Auger, 2006), è ai composti organici contenenti zolfo (*organosulfur compounds*, OSCs) che viene attribuito

preferenzialmente il potenziale chemiopreventivo di cipolla e aglio (Bianchini e Vainio, 2001).

Queste molecole (volatili) sono responsabili dell'odore pungente che si sprigiona in seguito al danneggiamento dei tessuti dei vegetali del genere *Allium*.

Gli OSCs si originano da un gruppo di 6 molecole che prendono il nome di S-alch(en)il cisteina solfossidi (fig. 5.5).

Mentre l'alliina è il principale solfossido dell'aglio, l'isoalliina è ubiquitaria ed è il principale precursore degli OSCs nella cipolla.

Gli S-alch(en)il cisteina solfossidi sono localizzati nel citoplasma delle cellule vegetali. Quando, in seguito al danneggiamento dei tessuti, vengono sottoposti ad azione enzimatica da parte dell'alliinasi, contenuta nei vacuoli cellulari della stessa pianta, i solfossidi sono convertiti in intermedi acidi sulfenici che, condensando, danno origine ai tiosulfinati (fig.5.6).

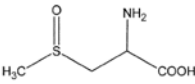
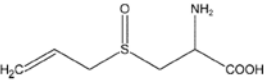
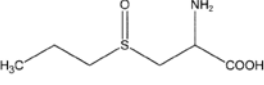
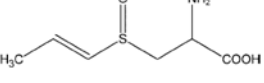
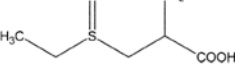
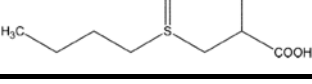
Chemical name	Chemical structure	Representative species
S-Methyl-L-cysteine sulfoxide		<i>A. cepa</i> L. <i>A. sativum</i> L. <i>A. chinense</i> G. Don <i>A. longicuspis</i> Rgl.
S-Allyl-L-cysteine sulfoxide		<i>A. sativum</i> L. <i>A. ursinum</i> L. <i>A. ampeloprasum</i> L. <i>A. longicuspis</i> Rgl.
S-Propyl-L-cysteine sulfoxide		<i>A. cepa</i> L. <i>A. porrum</i> L. <i>A. altaicum</i> Pall. <i>A. fistulosum</i> L.
S-Propenyl-L-cysteine sulfoxide		<i>A. cepa</i> L. <i>A. nutans</i> L. <i>A. ascalonicum</i> auct. <i>A. schoenoprasum</i> L.
S-Ethyl-L-cysteine sulfoxide		<i>A. aftatunense</i> B. Fedt. <i>A. ampeloprasum</i> L. <i>A. ochotense</i> Prokh. <i>A. victorialis</i> L.
S-n-Butyl-L-cysteine sulfoxide		<i>A. siculum</i>

Figura 5.5. S-alch(en)il cisteina solfossidi presenti nei vegetali del genere *Allium*.

Nella cipolla questi ultimi ammontano a circa $0.14 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ di peso fresco e sono principalmente caratterizzati dal gruppo 1-propenile.

I tiosulfinati sono molecole instabili e, in seguito a riarrangiamenti, danno origine a una grande varietà di composti (che a loro volta possono subire ulteriori trasformazioni) tra i quali tiosulfonati, mono-, di-, tri-sulfidi e polisulfidi. Nella cipolla il principale prodotto di decomposizione è rappresentato dal dipropil disulfide (DPDS) (fig. 5.7) (Rose e altri, 2005, Lanzotti, 2006).

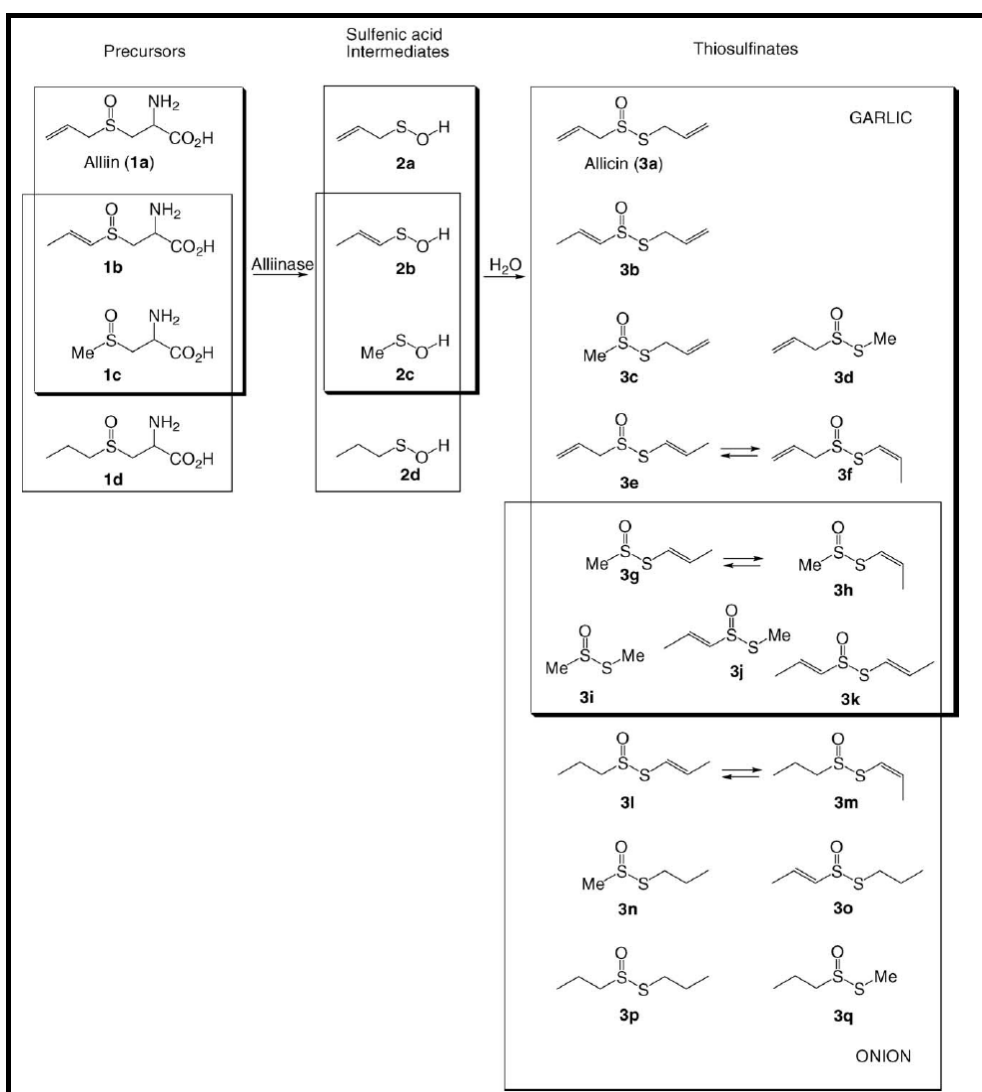


Figura 5.6. Pathway biosintetico dei tiosulfinati di aglio e cipolla.

Chemical structure	Compound	Abbreviation
	Diallyl disulfide	
	Allyl methyl disulfide	
	Methyl propenyl disulfide	
	1-propanethiol	
	Methyl propyl disulfide	
	dipropyl disulfide	
	1-propenyl propyl disulfide	
	Methyl propyl trisulfide	
	dipropyl trisulfide	
Chemical structure	Compound	Abbreviation
Lipid-soluble compounds		
$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	S-Allylcysteine sulfoxide (Alliin)	
$\text{CH}_3-\text{CH}=\text{CH}-\text{S}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	S-Propenylcysteine sulfoxide (lacrimary precursor)	
$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	S-Propylcysteine sulfoxide	
$\text{CH}_3-\text{S}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	S-Methylcysteine sulfoxide	
$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$	Allicin	
$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$	Ajoene	
$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{S}(\text{O})$	Propanethial S-oxide (lacrimary factor)	
$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$	Diallylsulfide	DAS
$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$	Diallyldisulfide	DADS
$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$	Diallyltrisulfide	DATS
$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_3$	Allylmethylsulfide	AMS
$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_3$	Allylmethyldisulfide	AMDS
$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_3$	Allylmethyltrisulfide	AMTS
$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$	Dipropylsulfide	DPS
$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$	Dipropyldisulfide	DPDS
$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$	Dipropyltrisulfide	DPTS
$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$	Propylmethylsulfide	PMS
$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_3$	Propylmethyldisulfide	PMDS
$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_3$	Propylmethyltrisulfide	PMTS
Water-soluble compounds		
$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	S-Allylcysteine	SAC
$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	S-Allylmercaptocysteine	SAMC
$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{S}-\text{H}$	Allylmercaptan	AM

Figura 5.7. Principali prodotti (sinistra), nome e sigla dei prodotti di degradazione dei tiosulfinati nella cipolla. Per le sigle utilizzate fare riferimento alla figura sopra riportata.

5.1.2 I meccanismi molecolari dell'attività chemiopreventiva dei vegetali del genere *Allium* e dei loro costituenti

Le prime evidenze del potenziale chemiopreventivo dei vegetali del genere *Allium* e dei loro costituenti (principalmente OSCs) sono emerse in studi di cancerogenesi sperimentale indotta chimicamente *in vivo*.

Tali esperimenti hanno messo in luce che gli effetti benefici non sono limitati ad una specie, tessuto o cancerogeno utilizzato. I singoli OSC, gli estratti oppure gli oli ricavati da aglio e cipolla impiegati per gli studi in oggetto sono stati solitamente somministrati per via cutanea, per diluizione nella dieta (200-2.000 ppm) oppure *per os* prima dell'esposizione al cancerogeno alle dosi di 0.01 e 0.02 mmol/topo o 50-200 mg/kg (ratto e topo). Di seguito ne viene mostrata una rassegna (fig.5.8) (Bianchini e Vainio, 2001).

Organ	Chemical component	Animal species, doses	Carcinogen	Effect on carcinogenesis	Reference
Forestomach	AMDS, AMTS, DAS, DATS PMDS, PMTS, DPS, DPTS AMDS, DADS, AM	Mouse, 0.02 mmol, po	BaP	Inhibition	(58)
		Mouse, 0.01–0.02 mmol, po	NDEA	No effect Inhibition (mainly DADS, AM)	(59)
Colon	DAS	Mouse, 200 mg/kg bw, po	DMH	Inhibition	(60)
	SAC	Mouse, 50–100 mg/kg bw, po	DMH	Inhibition	(61)
	DAS, DADS	Rat, 50–200 mg/kg bw, po	Combination	Inhibition (DADS)	(62)
	DADS	Rat, 200 ppm in diet	AOM	Inhibition	(63)
Esophagus	DAS	Rat, 200 mg/kg bw, po	NMBA	Inhibition	(64)
Mammary gland	DAS, DADS, AMS	Rat, 1.8 mmol/kg bw, po	DMBA	Inhibition	(65)
	Garlic powder	20 g/kg diet			
	Garlic powder	Rat, 1–4% in diet	DMBA	Inhibition	(66)
	SAC, DADS	Rat, 57 µmol/kg diet	MNU	Inhibition	(67)
Lung	Garlic powder	20 g/kg diet			
	SAC	Rat, 666 and 2,000 ppm in diet	MNU	No effect	(68)
	AMDS, DAS, AMTS, DATS, PMDS, PMTS, DPS, DPTS	Mouse, 0.02 mmol, po	BaP	Inhibition No effect	(58)
	AMDS, DADS, AM	Mouse, 0.01–0.02 mmol, po	NDEA	Inhibition	(59)
Liver	DAS	Rat, 50–100 mg/kg bw, po	DMH	Inhibition	(69)
	DAS, DADS	Rat, 50–200 mg/kg bw, po	Combination	Increase (DAS)	(62)
Kidney	DAS, DADS	Rat, 50–200 mg/kg b.w., po	Combination	Inhibition (DADS)	(62)
Uterine cervix	Garlic extract	Mouse, 400 mg/kg bw, po	MCA	Inhibition	(70)
Skin	Garlic oil, onion oil	Mouse, 10 µg–10 mg, pc	DMBA-TPA	Inhibition (mainly onion oil)	(71)
	Garlic oil	Mouse, 10% solution, pc	BaP-croton oil	Inhibition	(72)
	Garlic extract	Mouse, 5 mg dry weight, pc	DMBA-TPA	Inhibition	(73)
	DAS	Mouse, 250 µg, pc	DMBA, BaP	Inhibition	(74)

Abbreviations: AOM, azoxymethane; BaP, benzo[a]pyrene; DMBA, 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene; DMH, 1,2-dimethylhydrazine; MCA, 3-methylcholanthrene; MNU, *N*-methyl-*N*-nitrosourea; NDEA, *N*-nitrosodiethylamine; NMBA, *N*-nitrosomethylbenzylamine; pc, percutaneously; po, per os; TPA, 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate.

Figura 5.8. Effetto protettivo del genere *Allium* in esperimenti di cancerogenesi sperimentale indotta *in vivo*.

Oltre ad inibire la cancerogenesi chimica, molti OSCs sono efficaci nell'arrestare *in vivo* la crescita tumorale in esperimenti di xenotrapianto.

Il trattamento con DADS, per esempio, inibisce la crescita tumorale in topi nudi inoculati con la linea cellulare HTC-15 di coloncarcinoma umano (Sundaram e Milner, 1996), con fibroblasti NIH 3T3 trasformati con l'oncogene H-ras (Singh e altri, 1996) oppure con linee cellulari di tumore mammario umano (Nakagawa e altri, 2001). In esperimenti simili, invece, il composto fitochimico DATS ritarda la crescita della linea cellulare prostatica PC3 (Xiao e altri, 2006a) oppure di quella epatica HepG2 (Zhang e altri, 2007).

Anche il *phytochemical* SAC ha mostrato la capacità di inibire lo xenotrapianto di cellule tumorali prostatiche umane CWR22R inoculate in topi nudi, senza alcun effetto tossico (Chu e altri, 2007). Numerosi sembrano essere i meccanismi implicati nell'effetto chemiopreventivo di aglio, cipolla e dei loro costituenti.

- Modulazione degli enzimi del *drug metabolism* di fase I e II. Numerosi OSCs sono in grado indurre molti enzimi di fase II e/o inattivare il sistema monoossigenasico P450-dipendente *in vivo* in diversi organi. In particolare, è ampiamente documentato l'effetto a carico del CYP2E1, verso il quale il DAS e i suoi metaboliti funzionano da inibitori competitivi. In tale contesto i composti lipofili (fig. 5.7) sembrano essere più efficaci rispetto a quelli idrofili. Fra questi ultimi, quelli dotati di catene alliliche (come per esempio DAS, DPS, AMS, APS) esercitano gli effetti più importanti. In ogni caso, la modulazione esercitata sembra essere a livello traduzionale (diminuita sintesi proteica), ma non trascrizionale (Wargovich, 2006). Inattivazione enzimatica è stata inoltre registrata a carico del CYP3A e 1A (Chen e altri, 2004a).

Anche sugli enzimi di fase II l'effetto, induttivo in questo caso, degli OSCs è a largo spettro. In tale contesto, l'enzima maggiormente interessato è la GST. Inoltre, risentono fortemente dell'attività biologica degli OSCs anche l'UDPGT, la SULT, la NADPH chinone ossidoreduttasi 1 (NQO1 o DT-diaforasi) e l'eme-ossigenasi (HO-1) (Yang e altri, 2001a). Per questi ultimi due enzimi è stato messo in luce *in vitro* un meccanismo trascrizionale Nrf2-dipendente (Chen e altri, 2004a).

- Inibizione della mutagenesi. Il succo di cipolla saggiato mediante il test di Ames (con attivazione metabolica) protegge *S. typhimurium* TA98 dai mutageni presenti nella carne cotta (Kato e altri, 1998). Esperimenti analoghi condotti con aflatossina B₁ hanno dato medesimi risultati per l'aglio e i suoi derivati (Soni e altri, 1997).
- Inibizione della formazione di addotti al DNA. Il succo di cipolla ed aglio, attraverso l'inibizione dose-dipendente della reazione

di nitrosazione, prevengono *in vitro* la formazione di N-nitroso composti, potenti agenti cancerogeni che possono alchilare il DNA (Shenoy e Choughuley, 1992). L'aglio in polvere è in grado di inibire *in vivo* il tumore alla mammella indotto da 7,12-dimetilbenz[a]antracene (DMBA), attraverso la riduzione della formazione di addotti DMBA-DNA (Liu e altri, 1992).

- Attività antiossidante. Aglio, cipolla e derivati (oli, estratti o singoli *phytochemicals*) hanno mostrato attività antiossidante diretta ed indiretta *in vivo* ed *in vitro*. Solo per citare alcuni esempi, estratti di cipolla (ed aglio) aumentano la resistenza alla perossidazione lipidica indotta da nicotina in vari organi di ratto attraverso un'aumento dell'attività della catalasi, della SOD, della GPx ed un incremento del contenuto di GSH (Helen e altri, 1999). DAS, DADS, SAC, SEC, SMC, S-metilcisteina e S-propilcisteina prevengono l'ossidazione (e la glicazione) delle LDL nel plasma isolato da pazienti con diabete di tipo-2 (Huang e altri, 2004). In cellule epidermiche di topo, l'olio di cipolla (e di aglio) stimola l'attività della GPx ed inibisce la diminuzione del rapporto GSH/GSSG indotta da 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (Perchellet e altri, 1986).

- Inibizione della crescita cellulare. In tale contesto sembrano essere coinvolti almeno tre meccanismi: l'inibizione del metabolismo delle poliammine, il blocco del ciclo cellulare e l'induzione dell'apoptosi.

Il propenilsulfide, l'ajoene e l'olio di aglio inibiscono *in vitro* l'ornitina decarbossilasi, enzima coinvolto nella sintesi delle poliammine la cui concentrazione, solitamente, aumenta durante la proliferazione cellulare (Pinto e altri, 1997).

E' ampiamente documentata la capacità di numerosi OSCs, oli ed estratti ricavati da aglio e cipolla di arrestare attraverso numerosi meccanismi il ciclo cellulare in cellule tumorali mammarie, linee cellulari umane di colon, polmoni, pelle, cellule di neuroblastoma umano, di melanoma umano e murino e di carcinoma prostatico umano. Controversi sono invece i risultati ottenuti su cellule non

neoplastiche: mentre alcuni studi mettono in luce un'inibizione dell'attività proliferativa, altri non mostrano alcun effetto sulla crescita (Powolny e Singh, 2008, Bianchini e Vainio, 2001).

Numerosi sono anche i riferimenti riguardanti l'attività pro-apoptotica dei vegetali del genere *Allium* o dei loro derivati. A tale proposito, di particolare interesse è lo studio condotto da Arditti e altri (2005). L'anticorpo anti-CD20 ritubimax (ampiamente utilizzato per la cura dei linfomi non-Hodgkin) coniugato con l'enzima allinasi, attraverso la generazione *in situ* dell'allicina, è in grado di innescare l'apoptosi nella cellule CD20+ B-CLL e in altre linee cellulari di linfomi a cellule B *in vivo* (nel topo) e *in vitro*.

- Modificazione degli istoni. DADS inibisce la proliferazione di linee cellulari di colon umano attraverso iperacetilazione istonica dovuta all'inibizione dell'attività istone deacetilasi (Druesne e altri, 2004). Inibizione della proliferazione dovuta ad un aumento dell'acetilazione degli istoni è stata osservata anche in cellule DS19 in seguito ad incubazione con allucina, SAMC e SAC ed in cellule Caco-2 e T47D in risposta al composto fitochimico SAMC (Lea e altri, 2002).
- Inibizione dell'angiogenesi. DATS inibisce *in vitro* la migrazione e la formazione di capillari da parte di cellule endoteliali da cordone ombelicale attraverso l'inibizione del *pathway* di Akt, della secrezione del *vascular endothelial growth factor* (VEGF) e la *down-regulation* del recettore-2 di VEGF (Xiao e altri, 2006b).
- Attività antinfiammatoria. L'olio di cipolla, i cepaeni e i dimetil- e triallil- sulfidi in essa presenti sono in grado di interferire con il metabolismo dell'acido arachidonico attraverso l'inibizione di cicloossigenasi, lipoossigenasi e trombassano sintasi (Ali e altri, 2000). Inoltre, derivati dell'aglio (estratti o singoli composti) riducono la secrezione delle citochine pro-infiammatorie IL-1 β e TNF- α *in vitro* (Keiss e altri, 2003).
- Immunomodulazione. Tang e altri (1997) hanno riportato la capacità di una soluzione a base di aglio di contrastare *in vivo* il pre-

cancro orale indotto dalla 4-nitroquinolina 1-oxide attraverso l'attivazione delle cellule *natural killer* e dei linfociti T. Il DAS, inoltre, contrasta l'immunosoppressione cellulare ed umorale indotta da N-nitroso dimetilammina (NDMA) in topi BALB/C (Jeong e Lee, 1998).

- Proprietà antimicrobiche. Benché lo spettro antibatterico di aglio e cipolla sia piuttosto ampio, dal punto di vista chemiopreventivo, l'effetto più importante è rappresentato dalla capacità di inibire *in vitro* la crescita di *H. Pylori*, noto per aumentare il rischio di alcune forme di cancro dello stomaco (Sivam e altri, 1997).

5.1.3 Gli studi epidemiologici e le meta-analisi

I promettenti risultati ottenuti *in vivo* (in vari modelli animali) ed *in vitro* hanno trovato riscontro anche nell'uomo. Infatti, un'associazione inversa tra il frequente consumo di vegetali del genere *Allium* e lo sviluppo del cancro è stata messa in evidenza in numerosi studi epidemiologici. Ne viene fornita una rassegna in figura 5.9 A-D (Bianchini e Vainio, 2001).

In base ai valori di *odds ratio* (OR), si può notare come 28 dei 37 studi epidemiologici riportati mettano in evidenza l'effetto chemioprotettivo della cipolla e, più in generale, dei vegetali del genere *Allium*. In particolare, l'evidenza risulta piuttosto significativa per il cancro allo stomaco (9 studi su 12) e per quello al colon (9 studi su 11): tali risultati sono peraltro confermati da una meta-analisi della letteratura epidemiologica pertinente (Fleischauer e altri, 2000).

I risultati incoraggianti sulla protezione dal cancro allo stomaco e alla prostata, più di recente, sono stati ulteriormente confermati da studi epidemiologici condotti in Cina (Setiawan e altri, 2005 e Hsing e altri, 2002, rispettivamente).

Country	Cases/controls	Time of reference	<i>Allium</i> vegetable	OR ^a (p-value for trend)
Case-control studies				
Hawaii (Japanese)	220/440 (hospital)	Current diet	Onions (frequency)	0.48 Hawaiian Japanese 0.67 Japanese migrants 0.31 Migrant offspring
Japan	93/186 (hospital)	1–2 Years before onset	Onions (frequency)	2.13
Greece	110/100 (hospital)	Before onset	Onions (frequency)	0.68 (< 0.001)
China	241/241 (hospital)	Before onset	Onions, chives (kg/year)	No significant effect
Italy	1,016/1,159 (population)	2 Years before interview	Onions, garlic as condiments (frequency)	0.8 (0.04)
			Raw onions (frequency)	0.8 (< 0.01)
			Cooked onions (frequency)	1.1
			Cooked garlic (frequency)	0.4 (< 0.001)
China	564/1,131 (population)	6–8 Years before onset	Total <i>Allium</i> vegetables (kg/year)	0.4 (< 0.01)
			Scallions (kg/year)	0.8 (0.02)
			Garlic (kg/year)	0.7 (0.03)
			Chinese chives (kg/year)	0.6 (< 0.01)
			Onions (kg/year)	1.0 (0.46)
Poland	741/741 (hospital)	Before onset	Onions (frequency)	0.72 (0.01)
Spain	354/354 (hospital)	1 Year before onset	Onions (high vs low)	0.9
Belgium	449/3,524 (population)	Before onset	Cooked onions (g/week)	0.3 (< 0.0001)
			Cooked leeks (g/week)	0.29 (< 0.001)
Sweden	338/669 (population)	20 Years before interview	Onions (frequency)	0.84 (0.44)
			Leeks (frequency)	0.63 (0.001)
			Garlic (frequency)	0.89
China	153/234 (population)	Not specified	Garlic (frequency)	0.31
			Onions (frequency)	0.17
			Welsh onions (frequency)	0.22
			Chinese chives (frequency)	0.4
Cohort study				
The Netherlands	139/3,123	Last year before interview	Onions (n/day)	0.50 (0.03)
			Leeks (frequency)	0.69 (1.23)
			Garlic supplements	1.27

^aOdds ratio: highest versus lowest consumption.

Figura 5.9 A. Studi epidemiologici (caso-controllo e di coorte) sul consumo di vegetali del genere *Allium* e il rischio di cancro allo stomaco.

Country	Cases/controls	Time of reference	Allium vegetable	OR ^a (p-value for trend)
Case-control studies				
Japan	588/1,176 (hospital)	Not specified	Japanese leeks (frequency)	Colorectum 0.78 Low rectum 0.65
Japan	93/186 (hospital)	1-2 Years before onset	Onions (frequency)	Colon 3.84 Rectum (2.99)
Belgium	Colon 453/2,851 Rectum 365/2,851 (population)	1 Week before onset	Cooked onions (g/week) Cooked leeks (g/week)	Colon 0.16 Rectum 0.17 Colon 0.34 Rectum 0.23
China	336/336 (hospital)	Before onset	Garlic (yes/no)	Rectum, women 0.21
Argentina	110/220 (population)	5 Years before interview	Garlic, onions, pepper (frequency)	Colon 0.22 (0.004)
Australia	220/438 (population)	1 Year before interview	Onions (frequency)	Colon Men 0.86 Women 0.42 Proximal colon Men 0.23 Women 0.38 Distal colon Men 1.01 Women 0.57
Hawaii	1,192/1,192 (population)	3 Years before onset	Onions (g/day)	Colorectum Men 0.9 (0.34) Women 0.9 (0.37)
			Garlic (g/day)	Colorectum Men 0.7 (0.11) Women 0.7 (0.23)
Switzerland	223/491 (hospital)	2 Years before diagnosis	Garlic (frequency)	Colorectum 0.39 (< 0.01)
Cohort studies				
United States	212/35,004 Postmenopausal women	Last year before interview	Garlic (frequency)	Colon 0.68 Proximal colon 1 Distal colon 0.52 (< 0.05)
United States	205/47,949	Last year before interview	Garlic (frequency)	Colon 0.77 (0.14) Distal colon 0.63 (0.07)
The Netherlands	443/3,123	Last year before interview	Onions (n/day)	Colon Men 0.87 Women 1.49 Rectum Men 0.66 Women 1.34
			Leeks (frequency)	Colon Men 1.1 Women 1.18 Rectum Men 0.72 Women 1.31
			Garlic supplements	Colon 1.36 Rectum 1.28

^aOdds ratio: highest versus lowest consumption.

Figura 5.9 B. Studi epidemiologici (caso-controllo e coorte) sul consumo di vegetali del genere *Allium* e il rischio di cancro al colon-retto.

Cases/controls	Time of reference	<i>Allium</i> vegetable	OR ^a (p-value for trend)
196/392 (hospital)	Before onset	Onions (kg/year)	0.7 (0.33)
		Garlic (kg/year)	1.0 (0.24)
902/1,552	5 Years before interview	<i>Allium</i> vegetables (frequency)	Men 1.1 (0.69) Women 1.1 (0.34)
153/234 (population)	Not specified	Garlic (frequency)	0.30
		Onions (frequency)	0.25
		Welsh onions (frequency)	0.15
		Chinese chives (frequency)	0.57

*Odds ratio: highest versus lowest consumption.

Study	Country	Cases/controls	Time of reference	<i>Allium</i> vegetable	OR ^a (p-value for trend)
Lung Case-control	India	281/1,281 (selected population)	Before onset	Onions (frequency)	0.03 (< 0.001)
Cohort	The Netherlands	484/3,123	Last year before interview	Onions (n/day) Leeks (frequency) Garlic supplements	0.80 (0.7) 1.08 (0.58) 1.78
Laryngeal Case-control	China	201/414 (population)	10 Years before interview	Garlic (g/month)	Men 0.5 (0.02) Women 0.7
Nasal Case-control	China	60/414 (population)	10 Years before interview	<i>Allium</i> vegetables (g/month)	0.6 (NS)
Prostate Case-control	England	328/328 (population)	5 Years before interview	Garlic (frequency) Onions (frequency)	0.64 (0.13) 0.85 (0.65)
Brain Case-control	China	129/258 (hospital)	1 Year before onset	Garlic (g/month) Onions (g/month)	1.34 (0.13) 0.1 (< 0.01)
Endometrium Case-control	China	268/268 (population)	10 Years before interview	<i>Allium</i> vegetables (g/week)	0.7 (0.12)

NS, not significant.
*Odds ratio: highest versus lowest consumption.

Figura 5.9 C. Studi epidemiologici (caso-controllo e coorte) sul consumo di vegetali del genere *Allium* e il rischio di cancro all'esofago in Cina (in alto), ai polmoni, alla laringe, al naso, alla prostata, al cervello e all'endometrio in vari Paesi (in basso).

Country	Cases/controls	Time of reference	<i>Allium</i> vegetable	OR ^a (p-value for trend)
Case-control studies				
Greece	120/120 (hospital)	Before onset	Onions, leeks (frequency)	No significant effect
Switzerland	107/318 (hospital)	Before onset	Garlic (frequency)	0.6
France	345/345 (selected population)	Before interview	Onions (frequency) Garlic, onions (frequency)	0.5 (< 0.01) 0.3 (< 0.0001)
Cohort study				
The Netherlands	469/1,713	Last year before interview	Onions (n/day) Leeks (frequency) Garlic supplements	0.95 (0.65) 1.08 (0.32) 0.75

^aOdds ratio: highest versus lowest consumption.

Figura 5.9 D. Studi epidemiologici (caso-controllo e coorte) sul consumo di vegetali del genere *Allium* e il rischio di cancro al seno.

In uno studio epidemiologico condotto nell'area di San Francisco, aglio e cipolla sembrano proteggere dal cancro al pancreas (Chan e altri, 2005), mentre in Italia le evidenze sarebbero particolarmente consistenti per un consumo di cipolla da moderato ad elevato ed il tumore alla cavità orale, alla faringe, all'esofago, alla laringe, alle ovaie e al colon-retto (Galeone e altri, 2006). E' stata inoltre trovata un'associazione inversa tra il consumo dei vegetali del genere *Allium* e lo sviluppo di cancro all'endometrio (Galeone e altri, 2008) e di iperplasia prostatica benigna (Galeone e altri, 2007).

5.1.4 I trials clinici

I risultati promettenti riportati dalla letteratura epidemiologica, hanno portato alla conduzione di alcuni *trials* clinici volti ad esaminare l'effetto chemioprotettivo di alcuni *phytochemicals* che caratterizzano il genere *Allium*.

Li e altri (2004) hanno esaminato la possibile prevenzione del cancro allo stomaco attraverso la somministrazione quotidiana di elevate dosi di DATS (200 mg/giorno) e micro dosi di selenio (100 µg/giorni alterni) per un periodo di un mese di ciascun anno fra il 1989 ed il 1991. Dopo un *follow-up* di cinque anni, rispetto al gruppo di

controllo (placebo), i soggetti sottoposti a trattamento (2526) presentavano una riduzione del 22% dell'incidenza di tutti i tumori e del 47.3% di quella del cancro allo stomaco.

Nonostante i risultati incoraggianti, un *trial* clinico condotto successivamente con una supplementazione a base di aglio (olio ed estratto di aglio invecchiato) non avrebbe messo in evidenza alcun effetto benefico contro il cancro allo stomaco (You e altri, 2006).

L'estratto di aglio invecchiato sarebbe invece efficace contro il cancro al colon-retto. Alte dosi di estratto (2.4 ml/giorno) somministrate quotidianamente per un periodo di dodici mesi hanno determinato una riduzione del numero e delle dimensioni degli adenomi al colon in paziente con polipi colon-rettali (Tanaka e altri, 2006).

Anche l'ajoene ha mostrato il suo ruolo terapeutico nel cancro alla pelle. Infatti, la sua applicazione topica su noduli o carcinomi superficiali ha determinato una significativa riduzione delle dimensioni tumorali in 17 casi su 21 dopo sei mesi di trattamento (Tilli e altri, 2003).

5.2 Attività chemiopreventiva del pomodoro (*Solanum lycopersicum* o *Lycopersicum esculentum*)

Il pomodoro, in linea con gli attuali indirizzi nutrizionali (limitato apporto calorico unito alla presenza di numerosi nutrienti come vitamine e minerali), riveste grande importanza alimentare come uno dei principali componenti della dieta mediterranea. Tuttavia, ha gradualmente assunto una posizione di rilievo anche in ambito scientifico come fonte di *phytochemicals* bioattivi. Sulla base di tali presupposti, si pensa quindi che il pomodoro possa essere ascritto di diritto alla lista dei cosiddetti *functional foods*, definizione che si riferisce a quei cibi che contengono ingredienti che svolgono funzioni salutistiche oltre ad essere nutrimenti.

Infatti, il pomodoro e i suoi derivati (zuppe, succhi, passate, salse, concentrati, ketchup, ecc...) sembrano avere un ruolo protettivo nei

confronti di numerose patologie come cancro, disturbi cardiovascolari, affezioni visive, osteoporosi, ipertensione, infertilità maschile, patologie neurodegenerative (Alzheimer, sclerosi laterale amiotrofica, ecc.), enfisema polmonare. Queste proprietà vengono attribuite ai suoi numerosi composti fitochimici, ma soprattutto ai carotenoidi ed in particolare al licopene (Rao e Rao, 2007).

5.2.1 Il pomodoro ed i composti fitochimici

Benché gli effetti benefici del pomodoro vengano ascritti principalmente al licopene (Bhuvanewari e Nagini, 2005), vi è da precisare che tale frutto contiene in realtà una grande varietà di composti fitochimici.

Oltre ad essere un'importante fonte di acqua, carboidrati, fibre, proteine, aminoacidi essenziali e minerali come potassio, sodio, calcio, fosforo e ferro, il pomodoro è infatti ricco di vitamine e *phytochemicals* come polifenoli, glicocalcoidi e carotenoidi.

Per quello che riguarda le vitamine, nel pomodoro e i suoi derivati le più rappresentative sono la vitamina C ed E. Sono tuttavia presenti anche quella A (principalmente sotto forma di β - e γ -carotene) e B9 (acido folico) (fig. 5.10) (Canene-Adams e altri, 2005).

Fra i composti fenolici, invece, il pomodoro è fonte soprattutto di flavonoli. La loro presenza, massima nei frutti rossi maturi, è localizzata quasi interamente (99%) nel buccia del frutto e consiste quasi esclusivamente di coniugati della quercetina (soprattutto rutina) e del kaempferolo (fig. 5.11).

Nutrient	Tomato products (per 100 g) ²				
	Raw tomatoes	Catsup	Tomato juice	Tomato sauce	Tomato soup
Potassium, mg	237	382	229	331	181
α -tocopherol, mg	0.54	1.46	0.32	2.08	0.50
Vitamin A, IU	833	933	450	348	193
Vitamin C, mg	12.7	15.1	18.3	7.0	27.3
Total folate, μ g	15	15	20	9	7

Figura 5.10. Contenuto vitaminico del pomodoro e di alcuni suoi derivati.

tomato	free quercetin	free kaempferol	conjugated quercetin	conjugated kaempferol	total flavonol
whole	0.2 ± 0.0	0.5 ± 0.1	23.4 ± 1.2	1.2 ± 0.1	25.3 ± 1.3
skin	0.7 ± 0.0	0.4 ± 0.0	137.8 ± 5.6	4.4 ± 0.3	143.3 ± 5.8
flesh	nd	0.1 ± 0.0	0.9 ± 0.0	0.2 ± 0.1	1.2 ± 0.1
seed	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0	1.0 ± 0.1	0.2 ± 0.0	1.5 ± 0.1

Figura 5.11. Distribuzione dei flavonoli nel frutto di pomodoro ($\mu\text{g/g}$ di peso fresco).

Il contenuto totale di flavonoli può oscillare fra 1.3 e 22.2 $\mu\text{g/g}$ di peso fresco nelle differenti varietà.

I prodotti a base di pomodoro sono una buona fonte di composti fenolici (fig. 5.12): i flavonoli, per esempio, sono contenuti in massima misura nella purea con 72.2 $\mu\text{g/g}$ di peso fresco, ma sono presenti anche nel frutto principalmente in forma coniugata (Stewart e altri, 2000).

tomato product	brand	free quercetin	free kaempferol	conjugated quercetin	conjugated kaempferol	total flavonol	free flavonol %
tomato soup	Safeway	0.3 ± 0.0	nd	1.2 ± 0.1	nd	1.5 ± 0.1	19.6
tomato juice	Del Monte	2.9 ± 0.1	0.4 ± 0.0	11.5 ± 1.8	0.4 ± 0.1	15.2 ± 1.9	21.6
	Libby's	3.5 ± 0.2	0.4 ± 0.0	12.7 ± 1.0	0.3 ± 0.0	16.9 ± 1.0	22.9
canned cherry tomatoes	Napolina	nd	nd	1.7 ± 0.1	0.1 ± 0.0	1.8 ± 0.1	0
canned plum tomatoes	Napolina	nd	nd	0.3 ± 0.0	nd	0.4 ± 0.0	0
pasta sauce	Dolmio	1.2 ± 0.2	nd	7.9 ± 0.6	0.1 ± 0.0	9.2 ± 0.5	12.6
ketchup	Heinz	0.4 ± 0.0	nd	8.2 ± 0.5	0.1 ± 0.0	8.8 ± 0.5	4.5
purée	Casino	3.8 ± 0.2	0.6 ± 0.3	32.5 ± 4.0	0.2 ± 0.0	37.1 ± 4.3	11.9
	Masque D'or	5.4 ± 0.5	nd	10.9 ± 2.1	0.3 ± 0.0	16.6 ± 1.7	32.5
	Safeway	9.5 ± 1.6	nd	61.4 ± 5.5	1.3 ± 0.2	72.2 ± 5.8	13.2

^a Data for tomato juice and tomato soup are expressed as $\mu\text{g/mL} \pm \text{SE}$ ($n = 3$); all other data are expressed as $\mu\text{g/g}$ (fw) $\pm \text{SE}$ ($n = 3$)
nd, not detected.

Figura 5.12. Contenuto di flavonoli in prodotti a base di pomodoro.

Un altro flavonolo particolarmente abbondante nel pomodoro è la naringenina. Fra gli acidi idrossicinnamici, invece, elevato è il contenuto di acido clorogenico, caffeico, ferulico e p-cumarico (Minoggio e altri, 2003).

I glicocalcoidi sono composti contenenti azoto particolarmente abbondanti nella famiglia botanica della *Solanacee*, alla quale il pomodoro appartiene. I più rappresentativi della specie *L. esculentum* sono l' α -tomatina e la deidrotomatina (e i loro prodotti di idrolisi),

rispettivamente forme glucosilate degli alcaloidi steroidei tomatidina e tomatidenolo (fig. 5.13)

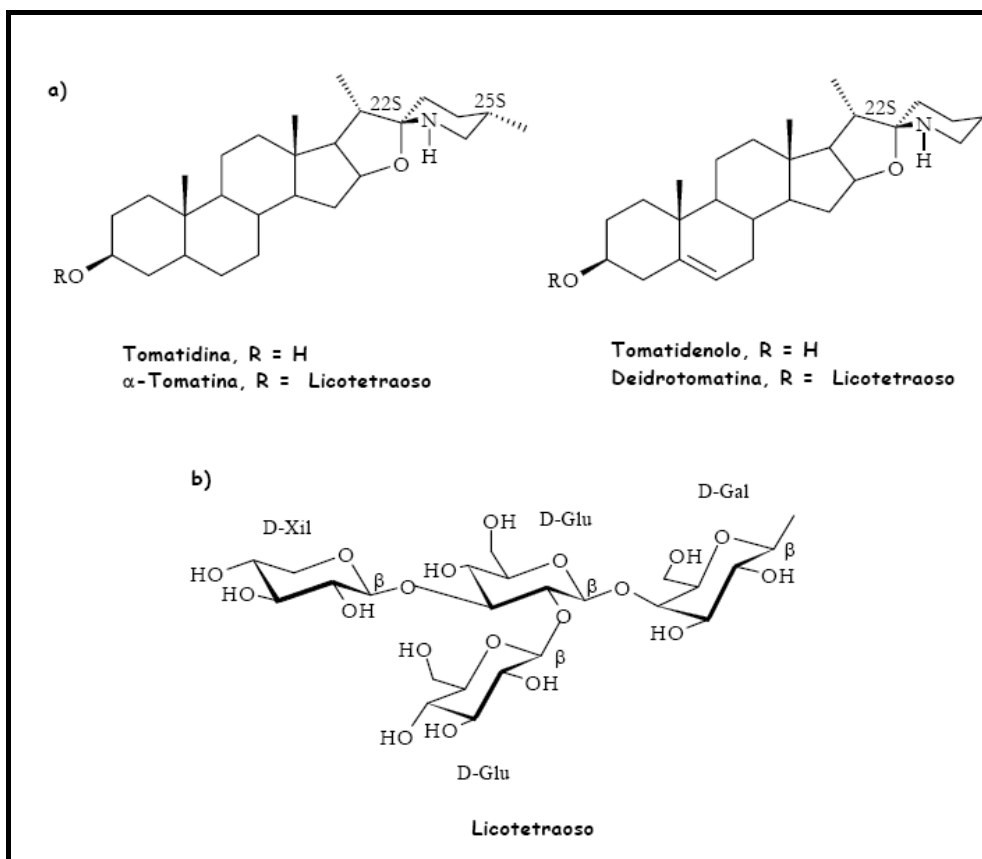


Figura 5.13. Struttura dei principali alcaloidi del pomodoro. A = agliconi; B = residuo glucidico.

Tali fitoalessine sono note per la loro attività antibiotica. La loro concentrazione infatti è molto elevata nei frutti immaturi (500 mg di l' α -tomatina/kg di peso fresco) e decresce gradualmente fino a ~5 mg/kg di peso fresco a maturazione ultimata. Anche i prodotti a base di pomodoro ne sono fonte (fig. 5.14).

α -Tomatina e deidrotomatina formano complessi insolubili ed estremamente forti con gli steroli animali e vegetali, soprattutto β -sitosterolo e fucosterolo. Si pensa che tali interazioni contribuiscano fortemente agli effetti biologici dei glicoalcaloidi.

variety	fruit wt (g)	mg of tomatine/kg	mg of tomatine/fruit
ripe			
Sungold cherry	3.9	11	0.04
red pear cherry	6.5	1.3	0.01
yellow pear cherry	10.3	4.5	0.05
yellow cherry	11.4	9.7	0.11
tomatillos	34.0	0.5	0.02
green Zebra	66.9	0.6	0.04
standard	123	0.3	0.04
large yellow	227	1.1	0.24
unripe green			
small immature	3.4	548	1.86
medium immature	17.1	169	2.88
large immature	37.9	10	0.39
pickled	80.0	28	2.20
mature	127	16	2.04
		mg/kg	
sample		fresh	freeze-dried
stewed red		11	20
juice		28	49
red sauce		57	50
fried green		11	44
microwaved green		12	134
ketchup		25	
pickled green, brand X		28	353
pickled green, brand Y		72	989

Figura 5.14. Contenuto di tomatina nel pomodoro acerbo e maturo (in alto) e in alcuni suoi derivati (in basso).

Insieme ai glicoalcaloidi, un'altra fitoalessina presente nel pomodoro è il sesquiterpene (C₁₅) riscitina, il cui contenuto è fortemente indotto da condizioni di stress biotico e abiotico (Friedman, 2002).

Un altro gruppo altamente reattivo (anche a dosaggi bassi) di *phytochemicals* alcaloidi individuato nella famiglia delle *Solanace* e, quindi, anche nel pomodoro è rappresentato dalle calistegine, ammine a nucleo nor-tropanico polidrossilate che, nella loro struttura, combinano un anello piperidinico ed uno pirrolidinico (Asano e altri, 1997).

Nonostante la grande varietà di nutrienti e *phytochemicals*, gli effetti benefici del pomodoro sono quasi esclusivamente attribuiti al contenuto di carotenoidi, molecole di cui tale ortaggio è particolarmente ricco (Bhuvanewari e Nagini, 2005).

I carotenoidi sono molecole costituite da una lunga catena polienica di atomi di carbonio (costituita da 35-40 atomi), terminante o meno in uno o due anelli. Le unità terminali, infatti, possono essere acicliche, come nel caso del licopene, oppure tutte e due cicliche, come nell' α - e β -carotene, o una ciclica e l'altra no, come nel γ -carotene.

La struttura della catena permette di dividere i carotenoidi in due classi: xantofille e caroteni.

Mentre le xantofille (come ad esempio luteina e zeaxantina) sono costituite da catene contenenti atomi di ossigeno, i caroteni (come licopene e carotene) presentano strutture prive di ossigeno formate solo da idrogeno, oltre che da carbonio (fig. 5.15).

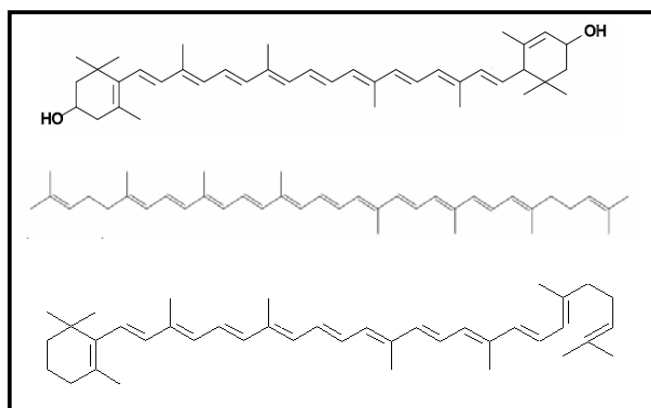


Figura 5.15. Struttura di tre carotenoidi: dall'alto verso il basso, luteina (xantofilla con entrambe le estremità cicliche), licopene e γ -carotene (caroteni aciclico e con una sola estremità ciclica, rispettivamente).

Il tipico colore dei carotenoidi, che spazia dal giallo pallido all'arancione fino al rosso acceso, è una diretta conseguenza della struttura molecolare di questi composti. I doppi legami della catena polienica dei carotenoidi, infatti, interagiscono tra di loro permettendo agli elettroni degli atomi interessati di muoversi più liberamente. All'aumentare dei doppi legami nella catena, aumenta anche la libertà di movimento degli elettroni: questo fa sì che lo spettro della luce assorbita da queste molecole diminuisca e, conseguentemente,

aumenti la lunghezza d'onda della luce riflessa che appare, perciò, di un colore tendente al rosso.

Grazie alla sua lunga catena polienica, il licopene è un forte agente antiossidante. I meccanismi proposti per il controllo dello stress ossidativo sono innumerevoli. Fra questi, il *quenching* fisico di $^1\text{O}_2$. Il licopene, infatti, risulta il più potente *quencher* di $^1\text{O}_2$ fra 600 carotenoidi di origine naturale (Di Mascio e altri, 1989). La dissipazione dell'energia assorbita da $^1\text{O}_2$ sottoforma di calore, ripristina la forma di licopene intatta, cosicché il pigmento è nuovamente pronto per l'interazione con $^1\text{O}_2$ (Krinsky, 1998).

E' inoltre in grado di reagire con i radicali, reazione che porta alla degradazione ossidativa del pigmento. Interagisce con ONOO^- e con i radicali liberi come HO^\bullet , NO_2^\bullet (Pannala e altri, 1998) e quelli perossilici (Woodall e altri, 1997). La reazione con i radicali, che avviene preferenzialmente in corrispondenza delle estremità elettron-dense del pigmento, genera un radicale del licopene che viene stabilizzato per risonanza grazie alla sua lunga catena polienica (Krinsky, 1998). Benché il licopene possieda un'importante attività antiossidante, *in vitro mix* di carotenoidi e l'associazione licopene-vitamina E (molto abbondante nel pomodoro) sono maggiormente in grado di proteggere dallo stress ossidativo rispetto al pigmento da solo (Shi e altri, 2004).

Il contenuto di carotenoidi (fig. 5.16) varia ampiamente nelle diverse tipologie di pomodoro ed aumenta con l'incrementare della colorazione rossa. Si va infatti da valori di 0.64 nei pomodori da insalata (più verdi) a 13.19 mg/100 g di peso fresco nei pomodorini *cherry* (molto rossi), *trend* che viene mantenuto anche dalla capacità antiossidante di questi frutti.

Come si può notare, in ogni caso, il carotenoide più abbondante è il licopene (Leonardi e altri, 2000). Caratteristica che ha fatto sì che gli effetti benefici del pomodoro fossero attribuiti proprio a questa molecola (Bhuvanewari e Nagini, 2005).

typology	lycopene	phytoene	phyto-fluen	lutein	ξ-carotene	β-carotene	lyc 5,6-diol	lyc 1,2-epoxide	neuro-sporene	γ-carotene	unident-ified	total carotenoids
salad	0.11 e	0.01 e	nd ^a	nd	0.05	0.08 e	nd	0.03 c	nd	nd	0.36	0.64 d
elongated	1.00 d	0.06 d	0.04 d	0.20a	0.90a	0.29 d	0.02 c	0.08 b	0.01 b	0.01 c	nd	2.60 c
cluster	7.90 b	0.47 c	0.23 c	0.01 b	0.01 c	0.49 c	0.06 b	nd	0.02 a	0.04 b	nd	9.24 b
cherry Ragusa	7.20 c	0.52 b	0.33 b	nd	nd	0.92 b	0.06 b	0.03 c	nd	0.03 b	nd	9.11 b
cherry Siracusa	10.80 a	0.61a	0.41a	nd	nd	1.05a	0.08a	0.17a	nd	0.07a	nd	13.19 a

^a nd, not detected.

Figura 5.16. Contenuto di carotenoidi (mg/100 g di peso fresco) in differenti tipologie di pomodoro.

Dal punto di vista strutturale, il licopene (ψ,ψ -carotene) (fig. 5.15) è un carotenoide aciclico con 40 atomi di carbonio ($C_{40}H_{56}$) e 13 doppi legami carbonio-carbonio, 11 dei quali coniugati. Nella sua molecola sono riconoscibili le 8 unità isopreniche, ciascuna costituita da 5 atomi di carbonio, che contraddistinguono i carotenoidi. Per via della mancanza dell'anello β -iononico, il licopene non possiede attività di pro-vitamina A.

Con pochissime eccezioni, la configurazione del licopene negli organismi vegetali, ed in particolare nel pomodoro fresco, è di tipo *all-trans*, la più stabile dal punto di vista termodinamico. Come poliene, tuttavia, può andare incontro ad isomerizzazione *cis-trans* in seguito a riscaldamento, esposizione alla luce o reazioni chimiche. Nel plasma umano oltre il 50% del licopene totale è, invece, costituito dagli isomeri *5-cis*, *9-cis*, *13-cis* e *15-cis* (fig. 5.17) e, per via della sua natura lipofila, si distribuisce principalmente in organi ricchi di lipidi come testicoli, ghiandole surrenali, prostata, mammelle e fegato (Rao e Rao, 2007).

I prodotti a base di pomodoro come succhi, concentrati, puree, passate o ketchup sono una fonte decisamente più abbondante di licopene (fig. 5.18). Nei pomodori freschi, infatti, il licopene è saldamente legato alla matrice, che ne ostacola il rilascio. Viceversa, nei prodotti trattati termicamente o finemente tritati, per effetto dell'indebolimento dei legami pigmento-proteina e della degradazione della parete cellulare e della matrice alimentare, il licopene viene rilasciato in grandi quantità.

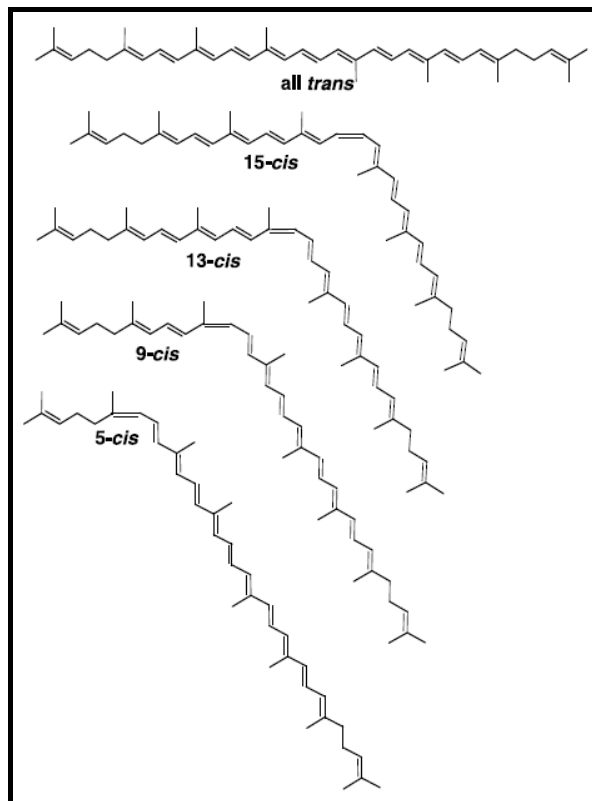


Figura 5.17. Strutture degli isomeri *cis* e *trans* del licopene.

Food	Lycopene content (mg/100 g wet wt)
Tomatoes, fresh	0.88-4.20
Tomatoes, cooked	3.70
Tomato sauce	6.20
Tomato paste	5.40-150.00
Tomato soup condensed	7.99
Tomato juice	5.00-11.60
Tomato, ketchup	12.71

Figura 5.18. Contenuto di licopene nel pomodoro e nei suoi derivati.

Unitamente alla presenza nella dieta di altri lipidi (come l'olio di oliva) oppure di altri carotenoidi (come il β -carotene) e all'isomerizzazione *trans-cis* indotta dal calore, ciò fa sì che la

biodisponibilità e l'assorbimento del licopene da prodotti a base di pomodoro, piuttosto che dal frutto fresco, aumentino (Bhuvaneshwari e Nagini, 2005).

Al di là delle concentrazioni fornite per alcuni *phytochemicals*, vi è tuttavia da precisare che i livelli dei composti benefici nel frutto di pomodoro non risultano fissi, ma vengono influenzati da numerosi fattori. Oltre alla componente varietale e allo stadio maturativo, infatti, fattori determinati sono rappresentati da condizioni di crescita come la temperatura e l'irradiazione (Gautier e altri, 2008).

5.2.2 I meccanismi molecolari dell'attività chemiopreventiva del pomodoro e dei suoi costituenti

Come anticipato precedentemente, la maggior parte della letteratura sulla chemioprevenzione del pomodoro riguarda quasi esclusivamente il licopene. Le evidenze maggiori interessano il cancro alla prostata, benchè numerosi siano i riferimenti anche per il tumore in altri siti.

Per esempio, è stata trovata un'incidenza di adenoma e carcinoma polmonari inferiore in topi maschi supplementari con licopene (50 ppm) in aggiunta a dietilnitrosammina, N-metil-N-nitrosourea e 1,2-dimetilidrazina rispetto agli animali di controllo (Kim e altri, 2000).

Il licopene ha mostrato di inibire la cancerogenesi gastrica indotta da N-metil-N'nitro-N-nitrosoguanidina e cloruro di sodio saturo in ratti maschi Wistar (Velmurugan e altri, 2002).

Un effetto protettivo di oleoresine di pomodoro arricchite di licopene, in termini di dimensioni e numero, è stato riscontrato *in vivo* in un esperimento di cancerogenesi della mammella indotta nei ratti da 7,12-dimetil-benz[a]antracene (Sharoni e altri, 1997), ma non nel caso del licopene puro e del tumore mammario indotto da N-metil-N-nitrosourea (Cohen e altri, 1999). Risultati positivi sono stati ottenuti anche nel caso di cancerogenesi spontanea nel topo (Nagasawa e altri, 1995).

In un modello animale (ratto) di epatocarcinogenesi, il trattamento con licopene ha determinato una riduzione delle dimensioni, ma non del numero, di foci preneoplastiche epatiche indotte da dietilnitrosammina (Astorg e altri, 1997).

Una riduzione di quasi il 58% delle foci precancerose di cripte aberranti è stata registrata nel colon di ratti trattati con licopene rispetto agli animali di controllo (Sengupta e altri, 2006). In un altro studio, tuttavia, il succo di pomodoro diluito (17 ppm), ma non il licopene puro ha inibito la colon-cancerogenesi in ratti trattati con N-metil-N-nitrosourea (Narisawa e altri, 1998).

Il succo di pomodoro ha mostrato attività chemiopreventiva nei confronti del cancro alla vescica in ratti iniziati con N-butil-N-(4-idrossibutil)-nitrosammina (Okajima e altri, 1998).

La somministrazione intragastrica di concentrato di pomodoro con tre differenti dosaggi di licopene si è dimostrata efficace nella prevenzione del carcinoma della tasca guancia di criceto iniziato con 7,12-dimetil-benz[a]antracene. Fra i dosaggi impiegati, quello corrispondente a 5 mg/kg di *p.c.* di licopene si è dimostrato più efficace rispetto alla dose superiore ed inferiore, evidenziando una curva dose-risposta a U rovesciata (Bhuvaneswari e altri, 2004).

Iniezioni intraperitoneali di licopene si sono dimostrate in grado di inibire la crescita di cellule C6 di glioma inoculate nel ratto (Wang e altri, 1989).

Per quello che riguarda la prostata, numerosi sono i riferimenti in letteratura. Il pomodoro in polvere si è mostrato più efficace del licopene nel prevenire il cancro alla prostata in ratti trattati con N-metil-N-nitrosourea e testosterone (Boileau e altri, 2003). In un esperimento analogo, il concentrato di pomodoro arricchito con FruHis, una chetosammina del pomodoro, si è mostrato più efficace, in termini di sopravvivenza, del pomodoro in polvere e del concentrato di pomodoro (non arricchito) nel prevenire il cancro alla prostata (Mossine e altri, 2008). La crescita del carcinoma prostatico di ratto Dunning R3327H trapiantato in ratti Copenhagen viene inibita

da diete contenenti pomodoro o licopene (Canene-Adams e altri, 2005). Siler e altri (2005) hanno dimostrato la capacità del licopene (200µg/g dieta) di inibire (in termini di induzione di necrosi) nei ratti il cancro alla prostata indotto da iniezione della linea cellulare prostatica di ratto MATLyLu nel lobo prostatico ventrale. La chetosammina del pomodoro FruHis insieme al licopene ha mostrato la stessa capacità (Mossine e altri, 2008). In un esperimento di xenotrapianto, il pigmento (100 e 200 mg/kg) ha mostrato inoltre di inibire la crescita tumorale di cellule prostatiche umane DU145 impiantate in topi nudi BALB/c (Tang e altri, 2005).

Numerosi sono i meccanismi proposti per spiegare gli effetti promettenti *in vivo* del licopene, del pomodoro e dei suoi derivati.

- Modulazione degli enzimi del *drug metabolism* di fase I e II. Mentre il trattamento di ratti femmina con licopene è in grado di determinare nel fegato una modesta induzione dose-dipendente dell'attività del CYP2B6 e 1A1, nessun effetto è stato riscontrato sul CYP1A2 e 2B1 (Breinholt e altri, 2000). Anche nel ratto maschio Wistar, una quasi totale assenza di modulazione della fase I è stata riscontrata non solo nel fegato (Jewell e O'Brien, 1999; Gradelet e altri, 1996), ma anche nei polmoni, reni ed intestino (Jewell e O'Brien, 1999). Più marcati sembrano invece gli effetti sugli enzimi di fase II. L'induzione dell'UDPGT segue una curva dose-risposta a U rovesciata nel fegato di ratti femmina (Breinholt e altri, 2000), la GST è stata trovata indotta in numerosi modelli animali: in modo dose-dipendente nei ratti femmina sani (Breinholt e altri, 2000), in un modello di cancerogenesi gastrica nel ratto (Velmurugan e altri, 2002), nel modello di carcinoma della tasca guancia di criceto (Bhuvanewari e altri, 2001 e 2002) e nel pollo trattato con tossina T2 (Leal e altri, 1999).

- Inibizione della mutagenesi. Il pretrattamento con concentrato di pomodoro riduce la frequenza di micronuclei indotti nel topo da 7,12-dimetil-benz[a]antracene (Chandra Mohan e altri, 2003) o da N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (Velmurugan e altri, 2004).

- Aumento della comunicazione intercellulare. In un *trial* clinico di fase II randomizzato e controllato, l'assunzione di 15 mg di licopene (comprese Lyc-O-Mato) due volte al giorno per tre settimane ha determinato un aumento dell'espressione della connessina 43 nel tessuto prostatico di pazienti affetti da tumore (Kucuk e altri, 2001).

- Attività antiossidante. Il licopene agisce come antiossidante diretto ed indiretto. Per quello che riguarda la sua attività diretta, il pigmento si è dimostrato in grado di prevenire il danno ossidativo *in vitro* a basse, ma non ad elevate dosi (Lowe ed altri, 1999), *in vivo* nei ratti trattati con nitrilotriacetato ferrico (Matos e altri, 2001) e in pazienti affetti da cancro alla prostata, nei quali il consumo di prodotti a base di pomodoro ha determinato una riduzione dello stress ossidativo anche nella ghiandola prostatica (Kucuk e altri, 2001; Chen e altri, 2001; Bowen e altri, 2002).

In riferimento alla sua attività indiretta, invece, i metaboliti del licopene inducono *in vitro* l'eme ossigenasi, la NADPH chinone ossido-reduttasi, la GST e la glutammato-cisteina ligasi (Lian e Wang, 2008). Le attività di GPx, Gred e i livelli di GSH ridotto sono stati trovati indotti in numerosi modelli animali: in un modello di cancerogenesi gastrica nel ratto (Velmurugan e altri, 2002), nel modello di carcinoma della tasca guancia di criceto (Bhuvanewari e altri, 2001 e 2002) e nel pollo trattato con tossina T2 (Leal e altri, 1999). Anche nel ratto (femmina) sano, gli stessi enzimi, unitamente a SOD, CAT e NADPH chinone ossido-reduttasi, vengono indotti dal licopene secondo una curva dose-risposta a U rovesciata (Breinholt e altri, 2000). Anche in soggetti affetti da ipertensione (Bose e Agrawal, 2007) o diabete mellito (Bose e Agrawal, 2006) la supplementazione con pomodoro è in grado di determinare un aumento del profilo degli enzimi antiossidanti. La transattivazione delle sequenze ARE attraverso il fattore trascrizionale Nrf2 è il meccanismo proposto per la regolazione degli enzimi antiossidanti da parte del licopene (Bendor e altri, 2005).

- Inibizione della crescita cellulare. In tale contesto sembrano essere coinvolti almeno tre meccanismi: l'induzione del differenziamento cellulare, il blocco del ciclo cellulare e l'induzione dell'apoptosi.

Il licopene, da solo o in associazione alla 1,25-diidrossivitamina D₃, ha mostrato di indurre il differenziamento della linea cellulare leucemica HL-60 (Amir e altri, 1999).

Il pigmento inibisce la transizione G1-S del ciclo cellulare in linee tumorali di mammella ed endometrio attraverso la riduzione dei livelli proteici di ciclina D1 e D3 e la ritenzione di p27 nel complesso ciclina E-cdk2 (Nahum e altri, 2001).

Il consumo di salsa di pomodoro per tre settimane (30 mg di licopene/giorno) ha determinato un aumento dell'indice apoptotico nel tessuto prostatico neoplastico e iperplastico rescisso da pazienti affetti da tumore (Bowen e altri, 2002).

- Modulazione del sistema *insulin growth factor-I* (IGF-I)/*insulin growth factor binding protein-3* (IGFBP-3). Nel modello di cancro prostatico di ratto MATLyLu la supplementazione con licopene (200 ppm) ha determinato una diminuzione locale dell'espressione dell'IGF-I (Siler e altri, 2004). Una *up-regulation* di IGFBP-3, con conseguente diminuzione dell'IGF-I *signalling*, è stata trovata nei polmoni di furetto supplementati con licopene (Liu e altri, 2003). Anche uno studio epidemiologico avrebbe messo in evidenza un'associazione inversa fra il consumo di pomodoro cotto e il livello di IGF-I plasmatico (Mucci e altri, 2001).

- Inibizione dell'attivazione e del *signalling* degli androgeni. Nel modello di cancro prostatico di ratto MATLyLu la supplementazione con licopene ha determinato una diminuzione locale dell'espressione della 5- α -reduttasi, enzima responsabile della conversione del testosterone in 5- α -idrossitestosterone. Quest'ultimo è responsabile della crescita fisiologica e iperplastica della ghiandola prostatica. Come conseguenza, numerosi geni regolati dagli androgeni sono stati trovati *down-regolati*: fra questi l'antigene prostata specifico (PSA)

(Siler e altri, 2004). Una diminuzione dei livelli di PSA sono stati riscontrati anche in pazienti affetti da cancro alla prostata in seguito al consumo di prodotti a base di pomodoro (Kucuk e altri, 2001; Chen e altri, 2001).

- Attività antinfiammatoria. Nel modello di cancro prostatico di ratto MATLyLu la supplementazione con licopene (200 ppm) ha determinato una diminuzione locale dell'espressione della citochina pro-infiammatoria IL-6 (Siler e altri, 2004). Il licopene, inoltre, è in grado di inibire *in silico* la 5-lipoossigenasi (Hazai e altri, 2006).

- Immunomodulazione. Il ripristino del differenziamento intratimico delle cellule T e l'aumento della sottopopolazione cellulare CD4+ è stato proposto come meccanismo di soppressione della crescita del tumore mammario in topi SHN trattati con licopene (Kobayashi e altri, 1996).

5.2.3 Gli studi epidemiologici e le meta-analisi

L'esistenza di un' associazione inversa tra il frequente consumo di licopene, pomodoro e suoi derivati e lo sviluppo del cancro ai polmoni e alla pleura, all'apparato digerente e allo stomaco, alla vescica, alla mammella ed agli organi riproduttori femminili è stata presa in considerazione in numerosi studi epidemiologici (Gioannucci, 1999). Tuttavia, poiché i risultati più promettenti ottenuti *in vivo* (in vari modelli animali) ed *in vitro* si riferiscono principalmente al cancro alla prostata e nell'uomo, fra i carotenoidi, il licopene è il più abbondante nella ghiandola prostatica (Kaplan e altri, 1990), nelle cui cellule eserciterebbe un effetto protettivo del DNA localizzandosi *in vitro* principalmente in corrispondenza del nucleo (Liu e altri, 2006), le indagini epidemiologiche si sono concentrate soprattutto sulla relazione tra consumo di licopene, pomodoro e suoi derivati e lo sviluppo del cancro alla prostata. La figura 5.19 (A-C) ne fornisce una rassegna esaustiva (Gioannucci, 2002).

Place of study	Years of study	Number of cases	Exposure	Relative risk ^a (95% CI)
Maryland	1974–1985	103	Serum lycopene Quartile 4 vs 1	0.50 (0.20–1.29) <i>P</i> = 0.26
Hawaii	1971–1993	142	Serum lycopene Quartile 4 vs 1	1.1 (0.5–2.2) <i>P</i> = 0.86
U.S.	1982–1995	578	Plasma lycopene >580 vs <262 ng/ml	Total: 0.75 = (0.54–1.06) <i>P</i> (trend) = 0.12 Aggressive: 0.56 (0.34–0.92) <i>P</i> (trend) = 0.05

^a Relative risk and 95% CI or *P* for exposure comparison indicated.

5.19 A. Studi epidemiologici sul consumo di licopene, pomodoro e derivati e il rischio di cancro alla prostata.

Place of study	Years of study	Number of cases	Exposure	Relative risk ^a (95% CI)
Minnesota	1976–1979	223	Tomato intake, high vs low	0.70 NS
Hawaii	1970–1983	452	Lycopene intake Quartile 4 vs 1	0.9 <i>P</i> = 0.35 <70 y 1.1 <i>P</i> = 0.57 ≥70 y
United Kingdom	1989–1992	328	Dietary lycopene ≥718 vs <402 μg Raw Tomatoes ≥5/week vs ≤3/month Cooked tomatoes ≥2/week vs <1/month Baked beans ^b ≥2/week vs <1/month	0.99 (0.68–1.45) <i>P</i> = 0.88 1.06 (0.55–1.62) <i>P</i> = 0.88 0.92 (0.57–1.42) <i>P</i> = 0.64 0.52 (0.31–0.88) <i>P</i> (trend) = 0.075
Athens, Greece	1994–1997	320	Raw tomatoes >30 vs <20/month Cooked tomatoes ≥28 vs <13/month	0.65 (0.40–1.0) <i>P</i> (trend) = 0.12 ^c 0.52 (0.33–0.83) <i>P</i> (trend) = 0.005
U.S.	1986–1999	449 (black) 483 (white)	Lycopene (combined food sources) ≥5/wk vs 0	0.9 <i>P</i> (trend) = 0.07
New Zealand	1996–1997	317	Lycopene Quintile 4 vs 1 Tomato, tomato-based foods Raw tomatoes	0.76 (0.50–1.17) <i>P</i> (trend) = 0.30 0.82 (0.53–1.26) <i>P</i> (trend) = 0.30 1.01 (0.66–1.53) <i>P</i> (trend) = 0.30
U.S. and Canada	1987–1991	1619	>108 g vs <20 g tomatoes/day >93 g vs ≤18 g cooked tomatoes/day	1.07 (0.83–1.38) <i>P</i> (trend) = 0.85 0.94 (0.58–1.52) <i>P</i> (trend) = 0.56
Seattle, WA	1993–1996	628	Cooked tomatoes	0.73 (0.48–1.10) <i>P</i> (trend) = 0.13 0.90 (0.57–1.42) <i>P</i> (trend) = 0.068 (adjusted for fruits and vegetables)
Canada	1989–1993	617	Dietary lycopene ≥9990 μg vs <4900 μg/day Tomatoes >73 g vs <24 g/day Lycopene >12,681 vs <2,103 μg/day	0.89 (0.60–1.31) <i>P</i> (trend) = 0.96 0.64 (0.45–0.91) <i>P</i> (trend) = 0.02 ^c 0.85 (0.75–0.97) <i>P</i> (trend) = 0.005

^a Relative risk and 95% CI or *P* for exposure comparison indicated.
^b Source of highly bioavailable lycopene.
^c Relative risk not given.

Figura 5.19 B. Studi epidemiologici sul consumo di licopene, pomodoro e derivati e il rischio di cancro alla prostata.

Place of study	Years of study	Number of cases	Exposure	Relative risk ^a (95% CI)
California Seventh Day Adventists	1974–1982	180	Tomato intake ≥5 vs <1/week	0.60 (0.37–0.97) <i>P</i> = 0.02
U.S.	1986–1992	773	Dietary tomato based products >10 vs <1.5 servings/week	0.65 (0.44–0.95) <i>P</i> = 0.01
			Tomato sauce 2–4 vs 0/week servings/week	0.66 (0.49–0.90) <i>P</i> = 0.001
Netherlands	1986–1992		Tomatoes (per 25 g increments)	1.05 (0.90–1.22)
U.S.	1987–1990	101	Dietary tomatoes Quintile 5 vs 1	0.50 (0.3–0.9) <i>P</i> = 0.03

^a Relative risk and 95% CI or *P*- for exposure comparison indicated; in some cases, measures other than the relative risk were given

Figura 5.19 C. Studi epidemiologici sul consumo di licopene, pomodoro e derivati e il rischio di cancro alla prostata.

I valori di rischio relativo riportati (*relative risk*, RR) sembrano suggerire un effetto protettivo del licopene, pomodoro e derivati. Anche due meta-analisi della letteratura epidemiologica pertinente supporterebbero tali tesi, sebbene l'evidenza più forte sarebbe riconducibile solo al consumo di elevate quantità di licopene, pomodoro e prodotti a base di tale frutto (Giovannucci, 1999; Etminan e altri, 2004). Forte è anche l'effetto benefico messo in luce per il cancro ai polmoni e allo stomaco, più modeste sono le evidenze per il tumore al pancreas, al colon-retto, all'esofago, alla cavità orale, alla mammella e alla cervice (Giovannucci, 1999).

5.2.4 I trials clinici

Le stesse considerazioni fatte per gli studi epidemiologici valgono anche per i *trials* clinici. Infatti, benché attualmente manchino studi di fase III, la maggior parte dei *trials* condotti su pazienti (fase II), riguarda il cancro alla prostata. Di seguito ne viene fornita una rassegna (fig. 5.20) (Dahan e altri, 2008). Fra quelli indicati, uno dei più significativi è rappresentato dallo studio randomizzato e controllato (placebo) condotto da Kucuk e altri (2001). In questo *trial*, infatti, l'assunzione di 30 mg/giorno di licopene sottoforma di capsule di Lyc-O-Mato per tre settimane prima dell'intervento di prostatectomia ha determinato un aumento dell'espressione della

connessina 43 nel tessuto prostatico ed una diminuzione della crescita tumorale, dei livelli di IGF-I e PSA plasmatici statisticamente significativi.

Per quello che riguarda invece gli studi di fase I, numerosi sono i riferimenti in letteratura. In figura 5.20 e 21 ne viene fornito un sommario (Basu e Imrhan, 2007). La quasi totalità degli studi, condotti con derivati del pomodoro e volti a monitorare i *biomarkers* di stress ossidativo e cancerogenesi, mette in luce la capacità antiossidante del frutto o dei suoi prodotti.

5.3 Attività chemiopreventiva dell'uva (*Vitis Vinifera*)

Le proprietà benefiche attribuite al vino/uva sono conosciute da sempre. La prima evidenza scientifica dell'esistenza di un effetto terapeutico, benefico legato all'uva proverrebbe da studi epidemiologici che, successivamente, hanno portato alla nascita del cosiddetto Paradosso Francese. Quest'ultimo fa riferimento all'esistenza di un legame tra l'assunzione moderata di vino rosso e la bassa incidenza di malattie cardiovascolari nella popolazione francese, nonostante un consumo molto elevato di grassi saturi (Renaud e de Lorgeril, 1992).

Da allora, le indagini scientifiche si sono intensificate in modo straordinario e, oltre agli effetti cardiovascolari, hanno messo in evidenza altre attività biologiche legate a questo alimento ed in particolare ad uno dei suoi *phytochemical*, il resveratrolo. Tra queste, oltre agli effetti metabolici, anti-invecchiamento (soprattutto in termini di sopravvivenza) e neurologici, molta attenzione ha suscitato l'attività anti-cancro (Markus e Morris, 2008), messa in luce per la prima volta da Jang e altri (1997) in un lavoro in cui il resveratrolo mostrò la capacità di interferire con tutti e tre gli stadi del processo di cancerogenesi.

Author (Year)	Source Description/Dose	Study Classification	Variables Measured	Results	Comments
Edinger and Koff	Food 50 g tomato paste (equivalent to 13 mg/d) × 10 wk	Dietary intervention	PSA	10.77% decrease in PSA in patients with BPH	Because increased plasma PSA typically marks the development of PCa, this intervention may have impacted the progression of disease
Chen et al	Food Tomato sauce (equivalent to 30 mg/d) × 3 wk	Dietary intervention	Serum and prostate lycopene concentrations, serum PSA levels, and leukocyte DNA oxidative damage measured before and after intervention	Postintervention, PSA levels decreased, serum and prostate lycopene statistically significantly increased, leukocyte oxidative DNA damage statistically significantly reduced, prostate tissue oxidative DNA damage statistically significantly lower compared with randomly selected controls	32 men with localized prostate adenocarcinoma
Jatoi et al	Food Tomato paste or juice (equivalent to 15 mg bid) × 4 mo	Dietary intervention	PSA	One > 50% reduction in PSA, 25/46 had progression	46 men with androgen-independent PCa
Kucuk et al	Supplement 15 mg bid × 3 wk prior to prostatectomy	Dietary intervention Randomized, placebo, case control	Plasma levels of lycopene, IGF-I, IGF binding protein 3, and PSA	73% of subjects in the intervention group had no involvement of surgical margins and/or extraprostatic tissues with cancer vs 18% in placebo group 84% of subjects in the lycopene group had tumors < 4 mL in size vs 45% in placebo group PSA levels decreased by 18% in the intervention group vs a 14% increase in the placebo group	26 men with newly diagnosed, clinically localized (14 T1 and 12 T2) PCa
Ansari and Gupta	Supplement 2 mg bid	Dietary intervention Randomized, case control	PSA	By 2 yr, consistently lower PSA than controls, with 78% having PSA < 4 ng/mL compared with 40% of controls	54 subjects with histologically confirmed metastatic PCa randomized to orchidectomy or orchidectomy + lycopene
Clark et al	Supplement Dose escalating 15–90 mg/d × 3 mo	Dietary intervention	PSA	No serum responses observed, and 37% had PSA progression	Plasma lycopene levels similar for wide dose range; well tolerated
Ansari and Gupta	Supplement 10 mg/d × 3 mo	Dietary intervention	PSA	One subject had CR,* 6 had PR, [†] 10 remained stable, and 3 progressed	20 patients with hormone-refractory metastatic PCa

BPH = benign prostatic hypertrophy; CR = complete response; DNA = deoxyribonucleic acid; IGF = insulinlike growth factor; PCa = prostate cancer; PR = partial response; PSA = prostate-specific antigen.

*Authors defined CR as a PSA < 4 ng/mL and absence of any sign of disease for > 8 weeks.⁵⁶

[†]Authors defined PR as > 50% decrease in PSA for > 8 weeks plus improvement in ECOG performance status and relief of bone pain.⁵⁶

Figura 5.20. Trials clinici condotti con pomodoro e derivati su pazienti affetti da cancro alla prostata a diversi stadi.

Subjects	Type and duration of lycopene supplementation	Effects on biomarkers of oxidative stress/ carcinogenesis
19 healthy subjects (mean age 29 years, BMI $24 \pm 2.8 \text{ kg/m}^2$)	0 mg lycopene (placebo), 39 mg lycopene (spaghetti sauce), 50 mg lycopene (tomato juice), or 75 mg lycopene (tomato oleoresin) per day for 1 week	25% decrease in LDL-TBARS 13% decrease in LDL-CD for all groups versus placebo ($P < 0.05$)
10 healthy subjects (mean age 23.1 ± 1.1 years, BMI $20.5 \pm 1.5 \text{ kg/m}^2$)	16.5 mg lycopene (60 g tomato puree), per day for 21 days	38% decrease in DNA damage in lymphocytes ($P < 0.05$)
23 healthy volunteers (mean age 34 ± 4 years, BMI $23 \pm 2 \text{ kg/m}^2$)	40 mg lycopene (330 ml tomato juice) for 2 weeks	12% decrease in plasma TBARS 18% increase in LDL lag time ($P < 0.05$) no effects on water-soluble antioxidants, FRAP, glutathione peroxidase and reductase activities ($P > 0.05$)
34 healthy females (mean age 37.5 ± 8.5 years, BMI $24 \pm 3.5 \text{ kg/m}^2$)	> 40 mg lycopene (200 g tomato puree + 100 g watermelon) per day for 7 days	Significant decrease in LDL oxidizability in nonsmokers ($P < 0.05$); no effects in smokers ($P > 0.05$)
9 healthy subjects (mean age 25.4 ± 2.2 years, BMI $20.3 \pm 1.5 \text{ kg/m}^2$)	7 mg lycopene (25 g tomato puree), per day for 14 days	50% decrease in DNA damage in lymphocytes ($P < 0.05$)
15 well-controlled type II diabetics (mean age 63 ± 8 years, BMI $30.9 \pm 7 \text{ kg/m}^2$)	Tomato juice (500 ml) per day or placebo for 4 weeks	Decreased LDL oxidizability versus baseline ($P < 0.001$)
175 healthy volunteers (mean age 33.5 ± 1 years, BMI $24.3 \pm 0.5 \text{ kg/m}^2$)	15 mg lycopene (natural tomato extract) or placebo per day for 12 weeks	No effects on LDL oxidation, reduced glutathione, protein SH groups and antioxidant metalloenzyme activities ($P > 0.05$)
9 healthy subjects (mean age 25.2 ± 2.2 years, BMI $20.2 \pm 1.6 \text{ kg/m}^2$)	7 mg lycopene (25 g tomato puree) with 150 g of spinach and 10 g of olive oil per day for 3 weeks	Decreased DNA oxidative damage ($P < 0.05$)
12 healthy subjects (mean age 31 ± 2.7 years, BMI $22.6 \pm 1.2 \text{ kg/m}^2$)	5, 10, 20 mg of lycopene from tomato ketchup or Lyc-O-Mato capsule per day for 2 weeks	10% decrease in serum MDA 23.6% increase in reduced thiols ($P < 0.05$)
32 healthy volunteers (mean age 31.7 ± 11.3 years, BMI $22.4 \pm 3.0 \text{ kg/m}^2$)	4.5 mg lycopene (as Lyc-O-Mato, in combination with β -carotene, α -carotene, bixin, lutein and paprika carotenoids) + 4 g fish oil, or 4 g fish oil only per day for 3 weeks	Decreased LDL oxidizability ($P < 0.05$) but nonsignificant decrease in DNA damage (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in urine) in carotenoid group + fish oil versus fish oil only
60 healthy subjects (mean age 52.6 ± 1.8 years, BMI not reported)	35 mg lycopene (condensed tomato soup), 23 mg lycopene (ready to serve tomato soup), or 25 mg lycopene (V8 vegetable juice), per day for 15 days	Increase in LDL lag time in all groups ($P < 0.05$) No effects on urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine or urinary F_2 -isoprostanes
12 healthy subjects (mean age 30 years, BMI 21 kg/m^2)	8 mg lycopene (tomato products: raw tomatoes, tomato sauce, tomato paste), with 5 g olive oil per day for 3 weeks (21 days)	Decrease in LDL oxidizability; Decrease in excretion of urinary F_2 -isoprostanes ($P < 0.05$)
22 healthy men (mean age and BMI not reported)	37 mg lycopene (330 ml of tomato juice) for 2 weeks	No effects on lipid peroxidation in plasma and feces ($P > 0.05$)
12 healthy subjects (mean age 25.2 ± 4.3 years, BMI $20.6 \pm 1.8 \text{ kg/m}^2$)	8 mg lycopene (100 g raw tomatoes, 60 g tomato sauce, 15 g tomato paste) per day for 3 weeks	Decreased DNA oxidative damage ($P < 0.05$); No effects on lymphocyte MDA levels ($P > 0.05$)
17 healthy subjects	30 mg lycopene (tomato juice, tomato sauce, tomato paste, ketchup, spaghetti sauce, and ready-to-serve tomato soup) per day for 4 weeks	Decreased lipid and protein oxidation ($P < 0.05$)
26 healthy subjects (mean age 25.8 ± 2.8 years, BMI $21.3 \pm 1.7 \text{ kg/m}^2$)	5.7 mg lycopene (Lyc-O-Mato, 250 ml), or placebo drink, per day for 26 days	42% decrease in DNA damage in lymphocytes ($P < 0.05$)
22 healthy volunteers with different PON1-192 genotypes (mean age 29 ± 6 years, BMI $23 \pm 2 \text{ kg/m}^2$)	37 mg lycopene (330 ml of tomato juice) per day for 2 weeks	Decreased lipid peroxidation in volunteers carrying the R-allele of the PON1-192 genotype; decreased plasma malondialdehyde in QR/RR subjects ($P < 0.05$)
37 healthy nonsmoking postmenopausal women (mean age 60 ± 2 years, BMI $25.48 \pm 1.08 \text{ kg/m}^2$)	12 mg of synthetic lycopene, or 4 mg of synthetic lycopene as part of mixed carotenoids, or placebo, per day for 56 days	Decreased endogenous DNA damage in both carotenoid supplemented groups versus baseline and placebo ($P < 0.01$)

Figura 5.21. *Trials* clinici condotti con pomodoro e derivati su volontari sani.

5.3.1 L'uva ed i composti fitochimici

La composizione chimica e i valori nutrizionali dell'uva nera, frutto della *Vitis Vinifera* utilizzata nel presente studio, sono riportati in figura 5.22 (fig. 5.22) (Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione – INRAN).

Come si può notare, la parte edule del frutto, costituita dagli acini (buccia, polpa e semi o vinaccioli), è un'ottima fonte di acqua, zuccheri semplici (glucosio e fruttosio), sali minerali (in particolare calcio, potassio e magnesio), acidi organici (fra i quali quello citrico, malico e tartarico, presente esclusivamente in questo frutto), vitamine, in particolare quella C ed E (tocoferoli e tocotrienoli). Quest'ultima si concentra principalmente nei semi. Mentre i tocoferoli sono distribuiti in modo omogeneo in tutti i tessuti degli acini (semi, pericarpo e mesocarpo, 20-100 µg/g di peso secco) e la loro concentrazione decresce con la maturazione, viceversa i tocotrienoli (principalmente γ) sono localizzati esclusivamente nell'endosperma dei semi e il loro contenuto aumenta con lo sviluppo dei semi (54±7.4 µg/g di peso secco in vinaccioli di 90 giorni) (Horvath e altri, 2006).

Per ciò che riguarda i composti fitochimici, l'uva è nota per la straordinaria varietà di polifenoli in essa contenuti.

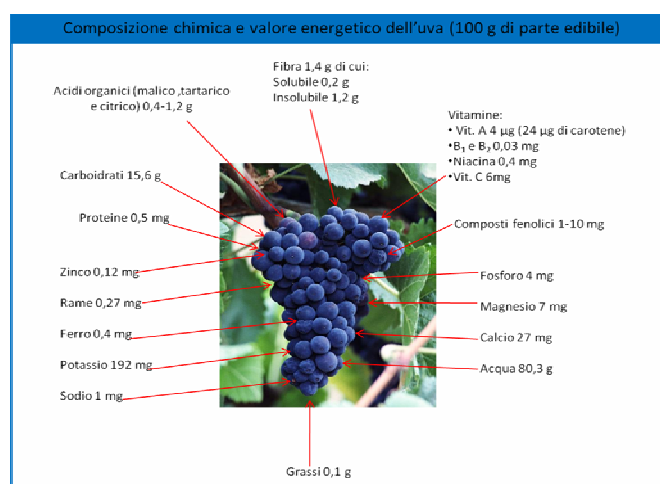


Figura 5.22. Valori nutrizionali dell'uva nera (Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione – INRAN).

Il termine polifenoli include parecchie classi di composti con una struttura chimica comune: si tratta infatti di derivati del benzene con uno o più gruppi idrossilici associati all'anello (Carratù e Sanzini, 2005). Le principali classi di polifenoli (soprattutto flavonoidi e stilbeni) sono presenti principalmente nella buccia e nei semi dell'uva. Il loro contenuto è molto più elevato nel frutto immaturo per poi decrescere progressivamente. A parità di livello di maturazione, l'uva nera è molto più ricca di polifenoli rispetto a quella di colore bianco, caratteristica correlata positivamente anche al suo maggiore potere antiossidante (Alonso Borbalán e altri, 2003).

Fra i composti fenolici, quelli che contraddistinguono l'uva nera da quella bianca sono le antocianine, *phytochemicals* appartenenti alla classe dei flavonoidi e responsabili della colorazione scura della esocarpo dell'uva nera. Tale carenza nell'uva bianca viene tuttavia compensata da un maggior quantitativo di flavan-3-oli fig. (5.23) (Cantos e altri, 2002).

	Red Globe	Flame	Crimson	Napoleon	Superior	Dominga	Moscatel Italica
% anthocyanins	51	42	52	56	0	0	0
% flavonols	27	15	10	24	47	28	33
% OH-cinnamates ^a	4	13	7	7	7	22	11
% flavan-3-ols	18	30	31	13	46	50	56

^a (OH-Cinnamates), hydroxycinnamic acid derivatives.

Figura 5.23. Distribuzione dei composti fenolici in quattro varietà rosse (*Red Globe*, *Flame Seedless*, *Crimson Seedless* e *Napoleon*) e tre varietà bianche (*Superior Seedless*, *Dominga* e *Moscatel Italica*) di uve da tavola.

Le antocianine ritrovate nella buccia dell'uva nera sono estremamente numerose e comprendono sia molecole glicosilate che acilate. Il contributo maggiore deriva tuttavia dalla malvidina-3-O-glucoside ed in secondo luogo dalla peonidina-3-O-glucoside (fig. 5.24) (Kammerer e altri, 2004).

	Cabernet Mitos		Lemberger		Spätburgunder		Schwarzriesling	Trollinger	
	2001	2002	2001	2002	2001	2002	2002	2001	2002
del 3-O-glc	2213 ± 38	5552 ± 48	470 ± 25	431 ± 19	183 ± 5	219 ± 21	81 ± 4	68 ± 3	105 ± 5
cya 3-O-glc	759 ± 35	1903 ± 11	79 ± 8	85 ± 2	80 ± 1	98 ± 2	37 ± 3	207 ± 11	382 ± 9
pet 3-O-glc	2643 ± 18	6680 ± 63	606 ± 15	65 ± 5	283 ± 9	463 ± 26	186 ± 4	116 ± 5	181 ± 10
peo 3-O-glc	4960 ± 16	12450 ± 158	515 ± 14	729 ± 35	678 ± 10	1786 ± 26	552 ± 14	715 ± 37	1371 ± 20
mal 3-O-glc	20533 ± 92	50981 ± 1000	7106 ± 298	7536 ± 343	4743 ± 104	10995 ± 142	4364 ± 118	1117 ± 44	1736 ± 19
del 3-O-acglc	392 ± 26	956 ± 8	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
pet 3-O-acglc	545 ± 32	1375 ± 11	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
peo 3-O-acglc	1371 ± 82	1484 ± 67	32 ± 11	nd	nd	nd	nd	27 ± 1	43 ± 6
mal 3-O-acglc	3110 ± 106	8688 ± 313	109 ± 0	nd	nd	nd	nd	45 ± 2	71 ± 3
cya 3-O-pcmglc	374 ± 8	1071 ± 50	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
pet 3-O-pcmglc	974 ± 26	2458 ± 0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
peo 3-O-pcmglc	2151 ± 94	6828 ± 57	68 ± 8	77 ± 12	nd	nd	nd	178 ± 19	398 ± 32
mal 3-O-pcmglc	10591 ± 201	31442 ± 192	877 ± 175	774 ± 77	nd	nd	nd	271 ± 22	458 ± 55
total AC content	50616 ± 774	131868 ± 1978	9862 ± 554	9697 ± 493	5967 ± 129	13561 ± 217	5220 ± 143	2744 ± 144	4745 ± 159

^a Abbreviations: del, delphinidin; cya, cyanidin; pet, petunidin; peo, peonidin; mal, malvidin; glc, glucose; ac, acetyl; pcm, p-coumaroyl; AC, anthocyanin; nd, not detected.

Figura 5.24. Contenuto di antocianine (mg/kg di esocarpo) in alcune varietà di uva nera.

Fra i flavonoli, invece, i derivati della quercetina apportano il maggior contributo, sia nell'uva nera che in quella bianca (fig. 5.25) (Cantos e altri, 2002).

flavonol ^b	Red Globe	Flame	Crimson	Napoleon	Superior	Dominga	Moscatel Italica
q-3-gluc	24.0 (2.1)	34.2 (2.6)	5.0 (1.1)	22.7 (1.7)	20.9 (1.7)	5.66 (0.6)	18.4 (3.5)
q-3-glc/rut	37.3 (7.5)	19.6 (3.5)	7.8 (2.8)	9.7 (4.0)	26.0 (1.2)	27.0 (2.0)	20.4 (1.7)
k-3-gal	tr ^c	tr	tr	tr	3.4 (0.4)	tr	0.5 (0.1)
k-3-glc	tr	tr	tr	tr	12.3 (1.4)	tr	4.7 (1.2)
i-3-glc	tr	tr	tr	tr	1.4 (0.1)	tr	3.7 (0.5)
tf	61.3 (9.6)	53.8 (6.0)	12.8 (3.5)	32.4 (5.5)	64.0 (4.6)	32.7 (2.7)	47.7 (6.1)

^a Values are expressed as mg/kg of fresh weight of grape berry (skin + flesh). Standard deviation is reported in parentheses ($n = 3$). ^b Abbreviations: q-gluc, quercetin 3-glucuronide; q-3-glc/rut, quercetin 3-glucoside + quercetin 3-rutinoside; k-3-gal, kaempferol 3-galactoside; k-3-glc, kaempferol 3-glucoside; i-3-glc, isorhamnetin 3-glucoside; tf, total flavonols. ^c Traces.

Figura 5.25. Contenuto di flavonoli (mg/kg di esocarpo e polpa) in quattro varietà rosse (Red Globe, Flame Seedless, Crimson Seedless e Napoleon) e tre varietà bianche (Superior Seedless, Dominga e Moscatel Italica) di uve da tavola.

Per quello che riguarda i derivati dell'acido idrossicinnamico, il 40-60% di questi ultimi è rappresentato dall'acido caffeiltartarico (fig. 5.26) (Cantos e altri, 2002), ma sono presenti anche l'acido caffeico, p-cumarico, ferulico, sinapico, cutarico e fertarico. Fra gli altri acidi fenolici, insieme ai derivati dell'acido idrossicinnamico, vi sono gli

idrossibenzoati: acido gallico, p-idrossibenzoico e siringico (Kammerer e altri, 2004).

	Red Globe	Flame	Crimson	Napoleon	Superior	Dominga	Moscatel Italica
cafta	5.2 (0.7)	28.6 (3.4)	5.7 (0.8)	5.7 (0.2)	3.5 (0.5)	15.9 (2.2)	10.4 (1.7)
derv-a	1.1 (0.2)	4.4 (0.2)	1.1 (0.2)	1.0 (0.2)	1.8 (0.4)	2.5 (0.3)	2.1 (0.4)
couta	2.1 (0.3)	14.6 (1.3)	2.7 (0.2)	2.8 (0.2)	3.7 (0.5)	6.6 (0.3)	3.8 (0.4)
TH	8.4 (0.2)	47.6 (4.8)	9.5 (0.5)	9.5 (0.5)	9.0 (0.9)	25.0 (0.9)	16.3 (2.0)

Figura 5.26. Contenuto di derivati dell'acido idrossicinnamico (mg/kg di buccia e polpa) in quattro varietà rosse (*Red Globe*, *Flame Seedless*, *Crimson Seedless* e *Napoleon*) e tre varietà bianche (*Superior Seedless*, *Dominga* e *Moscatel Italica*) di uve da tavola.

Catechina, gallocatechina, epigallocatechina sono fra i flavan-3-oli più abbondanti nella buccia e polpa dell'uva insieme alle loro forme polimeriche proantocianidina (procianidina o leucocinidine) B1, B2, B4 e C1 (Cantos e altri, 2002). Vi è tuttavia da precisare che il loro contenuto è estremamente più abbondante nei semi, nei quali, rispetto all'esocarpo, presentano un minor grado di polimerizzazione e un maggior livello di esterificazione con il gallato (Fernández e altri, 2007). I semi, non solo presentano un maggior quantitativo di flavan-3-oli, ma posseggono, in generale, un più elevato contenuto di polifenoli (2.28-18.76 mg/kg di peso secco per l'uva nera) rispetto all'esocarpo, nella quale il profilo fenolico è invece dominato da flavonoli e stilbeni (Kammerer e altri, 2004). La composizione fenolica dei semi di alcune varietà di uva nera è mostrata in figura 5.27 (Guendez e altri, 2005).

Nonostante la grande varietà di *phytochemicals* presenti nell'uva, la molecola che più di ogni altra ha suscitato interesse dal punto di vista farmacologico è lo stilbene resveratrolo, anche se, ultimamente, molte indagini scientifiche sono state compiute sulle proantocianidine.

Red grape varieties	Amount of polyphenol (mg/100 g seeds) ^a								Total ^b
	Gallic acid	Catechin	Epicatechin	Epicatechin 3-O-gallate	Epigallocatechin 3-O-gallate	Epigallocatechin	Procyanidin B ₁	Procyanidin B ₂	
Pardala	2.50 ± 0.08	274.75 ± 2.24	109.50 ± 2.44	12.97 ± 0.14	4.95 ± 0.44	7.00 ± 1.22	23.77 ± 0.42	14.37 ± 0.02	449.81
Refosko	2.00 ± 0.40	49.40 ± 2.44	27.65 ± 1.34	33.50 ± 2.04	0.50 ± 0.00	0.00	3.60 ± 0.16	0.50 ± 0.00	117.15*
Cabernet Sauvignon	2.79 ± 0.00	214.95 ± 0.15	89.27 ± 0.42	27.88 ± 1.35	6.46 ± 0.23	0.00	14.80 ± 0.49	11.30 ± 3.27	367.45
Grenache Rouge	3.43 ± 0.18	203.00 ± 3.26	86.75 ± 0.20	18.57 ± 1.04	9.52 ± 1.41	5.95 ± 0.85	10.62 ± 0.02	6.07 ± 0.06	343.91
Merlot	2.72 ± 0.01	182.83 ± 3.59	83.40 ± 1.20	58.00 ± 0.08	13.45 ± 2.08	12.92 ± 0.06	13.45 ± 1.17	17.55 ± 0.36	384.32
Moschofilero	8.59 ± 0.00	343.50 ± 0.57	218.10 ± 0.57	128.40 ± 2.44	26.90 ± 0.40	0.00	0.00	30.30 ± 4.49	755.79*
Aidani Mavro	1.27 ± 0.02	98.25 ± 3.47	38.45 ± 1.26	23.10 ± 0.04	2.90 ± 0.24	0.00	0.75 ± 0.06	2.07 ± 1.65	166.79*
Krasato	2.82 ± 0.02	86.75 ± 0.20	35.07 ± 0.10	17.75 ± 0.12	0.00	0.00	0.00	0.00	142.39*
Thraspa	5.87 ± 0.51	50.87 ± 0.10	33.37 ± 2.75	86.50 ± 3.67	0.25 ± 0.02	0.25 ± 0.02	1.12 ± 0.91	0.37 ± 0.10	178.60**
Papadiko	0.54 ± 0.00	21.04 ± 0.71	10.91 ± 0.06	8.01 ± 0.21	1.10 ± 0.24	0.00	1.49 ± 0.08	0.92 ± 0.00	44.01*
Limniona	2.25 ± 0.20	208.59 ± 0.75	91.75 ± 2.24	32.70 ± 0.00	13.50 ± 2.44	0.00	5.75 ± 1.02	9.00 ± 0.40	363.54
Mavro Messenikola	1.45 ± 0.33	100.27 ± 1.16	37.34 ± 1.35	9.94 ± 0.06	0.00	0.35 ± 0.09	0.00	0.07 ± 0.03	149.42*
Mandilaria	10.45 ± 0.44	453.50 ± 0.40	248.50 ± 6.94	64.42 ± 0.83	15.61 ± 3.44	0.00	102.25 ± 6.32	69.15 ± 5.59	963.89*
Agiorgitiko	17.90 ± 1.63	245.00 ± 4.08	171.50 ± 5.30	41.25 ± 2.24	10.89 ± 3.27	5.25 ± 4.28	31.85 ± 1.18	36.10 ± 3.18	559.74***
Vapsa	29.50 ± 1.14	309.00 ± 2.44	239.50 ± 1.22	128.50 ± 2.04	22.80 ± 1.14	5.00 ± 1.08	58.50 ± 3.67	60.75 ± 2.49	853.55*
Karlachanas	4.49 ± 0.23	390.00 ± 8.16	166.11 ± 1.96	145.50 ± 2.85	0.00	0.27 ± 0.12	9.90 ± 1.08	14.43 ± 0.87	730.70*
Negoska	1.24 ± 0.12	185.80 ± 0.13	72.93 ± 0.80	46.72 ± 0.48	6.66 ± 0.01	2.50 ± 0.94	9.11 ± 0.31	12.48 ± 0.26	337.44
Xinomavro	0.85 ± 0.03	36.67 ± 0.10	17.47 ± 0.80	0.14 ± 0.00	0.05 ± 0.01	0.00	0.00	0.12 ± 0.02	55.10*
Araklinos	1.67 ± 0.02	156.25 ± 5.10	59.75 ± 0.20	42.05 ± 0.04	0.00	0.00	0.00	1.72 ± 0.40	261.44
Muscato of Hamburg	7.40 ± 0.16	228.50 ± 2.85	120.50 ± 2.85	20.60 ± 0.34	6.00 ± 0.81	0.00	21.59 ± 0.32	20.12 ± 1.00	424.71
Fileri	15.05 ± 0.44	483.00 ± 7.34	262.00 ± 2.44	139.35 ± 0.53	35.75 ± 1.02	0.00	85.50 ± 3.67	61.00 ± 1.63	1081.65*
Mavrodafni	2.87 ± 0.02	129.60 ± 0.16	97.80 ± 0.49	48.70 ± 0.65	0.65 ± 0.13	0.00	17.18 ± 0.34	21.23 ± 1.57	318.03
Avgoustiatis	0.62 ± 0.10	112.96 ± 1.40	40.57 ± 0.51	34.97 ± 0.30	0.03 ± 0.02	0.00	0.15 ± 0.02	1.32 ± 0.06	190.62***
Sangiovese	3.70 ± 0.16	166.05 ± 0.36	111.50 ± 1.22	54.85 ± 0.61	6.05 ± 0.44	0.00	14.05 ± 0.20	16.50 ± 3.67	372.70
Limnio	1.15 ± 0.04	51.25 ± 0.61	20.10 ± 0.12	13.75 ± 0.20	0.25 ± 0.02	0.00	0.00	0.08 ± 0.03	86.58*
Mean ^c	5.32 (1.37)	191.27 (49.30)	99.59 (25.67)	49.52 (12.76)	7.37 (1.90)	1.58 (0.41)	17.02 (4.39)	16.30 (4.20)	387.97

^a Mean values and standard deviations (n = 3).
^b Statistically different (Student's t-test): * p < 0.001; ** p < 0.002; *** p < 0.01.
^c Values in parentheses indicate the percentage contribution of each polyphenol to the total amount.

Figura 5.27. Composizione fenolica di estratti di semi di alcune varietà di uva nera.

Il resveratrolo (trans-3,5,4'-triidrossi-trans-stilbene, fig. 5.28), soprattutto in seguito all'infezione da parte di *Botrytis cinerea*, è sintetizzato esclusivamente nell'epidermide fogliare e nell'esocarpo, ma non nella polpa (Creasy e Coffee, 1988).

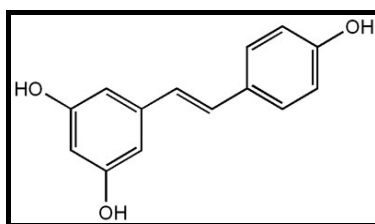


Figura 5.28. Struttura chimica del resveratrolo.

Di conseguenza, poiché durante il processo di produzione del vino bianco gli epicarpi non vengono fatti fermentare, solo il vino (ma

anche l'uva) di colore rosso contiene quantità considerevoli di questo composto e dei suoi derivati (fig. 5.29).

Source	<i>trans</i> -Resveratrol concentration	Comments
<i>Dietary</i>		
Red wines	0.1–14.3 mg l ⁻¹	<i>cis</i> -Resveratrol, <i>trans</i> -piceid and <i>cis</i> -piceid also present, typically at slightly lower concentrations
White wines	<0.1–2.1 mg l ⁻¹	Generally resveratrol found at concentrations of <0.1 mg l ⁻¹ , exceptions include Swiss, Portuguese and German Riesling wines, <i>cis</i> -resveratrol, <i>trans</i> -piceid and <i>cis</i> -piceid also present
Ports and sherries	Generally <0.1 mg l ⁻¹	
Grapes*	0.16–3.54 µg g ⁻¹	Contents are similar for wine or table grapes, and black or white grapes. <i>trans</i> -Piceid is predominant at concentrations of 1.5–7.3 µg g ⁻¹
Dry grape skins	24.06 µg g ⁻¹ (average)	<i>trans</i> -Piceid and <i>cis</i> -piceid found at concentrations of 42.19 µg g ⁻¹ and 92.33 µg g ⁻¹ , respectively
Red grape juices	0.50 mg l ⁻¹ (average)	<i>trans</i> -Piceid, <i>cis</i> -piceid and <i>cis</i> -resveratrol found at concentrations of 3.38 mg l ⁻¹ , 0.79 mg l ⁻¹ and 0.06 mg l ⁻¹ , respectively
White grape juices	0.05 mg l ⁻¹ (average)	<i>trans</i> -Piceid and <i>cis</i> -piceid found at concentrations of 0.18 mg l ⁻¹ and 0.26 mg l ⁻¹ , respectively
Cranberry raw juice	~0.2 mg l ⁻¹	<i>cis</i> -Resveratrol also found at a concentration of ~0.03 mg l ⁻¹

Figura 5.29. Contenuto di resveratrolo nell'uva e nei suoi derivati.

Come si può notare la concentrazione del resveratrolo è molto variabile. Esistono infatti differenze nel quantitativo di queste molecole tra frutti della stessa pianta e spesso in diversi lati del frutto stesso e ciò, chiaramente, ne determina una estrema difficoltà nella quantificazione (D'Archivio e altri, 2007).

Dal 1997 in poi, data in cui Jang e altri, per la prima volta, documentarono l'attività anti-cancro della molecola, al resveratrolo è riferita la maggior parte della letteratura scientifica riguardante gli effetti benefici dell'uva, nonostante la grande varietà di composti fitochimici in essa presenti.

Tuttavia, nonostante gli innegabili risultati ottenuti *in vivo*, una grande varietà di studi condotti nell'animale e nell'uomo ha dimostrato la scarsa biodisponibilità di questa molecola, dovuta al ridotto assorbimento, alla breve emivita (8-15 minuti) e al considerevole metabolismo (principalmente glucuronidazione e solfatazione) (fig. 5.30). Conseguentemente, si sta iniziando a pensare

che ad esercitare gli effetti salutistici riscontrati non sia direttamente (o solamente) il resveratrolo, ma anche i suoi metaboliti (Baur e Sinclair, 2006).

Species	Dose*	Serum peak		Normalized to 1 mg kg ⁻¹	
		Authentic	Derivatives	Authentic	Derivatives
<i>Single dose as pure resveratrol</i>					
Rat	50	6.6 µM	105 µM (glucuronide)	130 nM	2.1 µM (glucuronide)
Rat	2	~2.4 µM		1.2 µM	
Rat	20	1.2 µM		60 nM	
Rat	2	0.09 µM	1.2 µM (total)	22 nM	0.6 µM (total)
	5	0.11 µM	1.5 µM (total)	45 nM	0.3 µM (total)
Rat	2	0.77 µM		380 nM	
Mouse	240	32 µM		46 nM	
Mouse	20	2.6 µM		130 nM	
Mouse	20	Trace	~5 µM (sulphate) ~1 µM (glucuronide)	Trace	0.25 µM (sulphate) 0.05 µM (glucuronide)
	60	Trace	~300 µM (sulphate) ~170 µM (glucuronide)	Trace	5 µM (sulphate) 2.8 µM (glucuronide)
Rabbit	20	1.1 µM		55 nM	
Human	25 mg per 70 kg body weight	~37 nM	~2.1 µM (total)	100 nM	5.9 µM (total)
Human	25 mg per person	<22 nM	~2.1 µM (total)	<81 nM	7.7 µM (total)
<i>Single dose as red wine</i>					
Rat	80 µg per kg	~88 nM		~1.1 µM	
Rat	86 µg per kg	~88 nM		~1.0 µM	
Human	3.4 µg per kg	ND	0-0.11 µM (3-glucuronide) 0-0.42 µM (4'-glucuronide)	ND	0-32 µM (3-glucuronide) 0-120 µM (4'-glucuronide)
	32.9 µg per kg	ND	0-0.19 µM (3-glucuronide) 0-2.2 µM (4'-glucuronide)	ND	0-5.8 µM (3-glucuronide) 0-67 µM (4'-glucuronide)
	7.5 µg per kg	0-26 nM	0-0.16 µM (3-glucuronide) 0-1.3 µM (4'-glucuronide)	0-3.5 µM	0-21 µM (3-glucuronide) 0-170 µM (4'-glucuronide)

*Quoted as mg per kg body weight unless stated otherwise. ND, none detected.

Figura 5.30. Concentrazione plasmatica del resveratrolo e dei suoi metaboliti in seguito a somministrazione orale.

5.3.2 I meccanismi molecolari dell'attività chemiopreventiva dell'uva e dei suoi costituenti

Le prime evidenze del potenziale chemiopreventivo dell'uva ed in particolar modo del resveratrolo sono emerse in studi di cancerogenesi sperimentale *in vivo* indotta attraverso vari meccanismi (chimicamente, inoculazione di cellule cancerose, xenotrapianto, ecc..) Tali esperimenti hanno messo in luce che gli effetti benefici sono a largo spettro e non limitati ad una specie, tessuto o cancerogeno utilizzato. Di seguito ne viene mostrata una rassegna (fig. 5.31 A e B) (Baur e Sinclair, 2006).

Alcuni lavori, tuttavia, mettono in luce l'incapacità del resveratrolo di interferire con il processo di cancerogenesi. Per esempio, nel topo la somministrazione per via intraperitoneale di 1-5 mg/kg di peso corporeo (p.c.) dello stilbene non ha contrastato la crescita o il potenziale metastatico del tumore alla mammella (Bove e altri, 2002). La supplementazione della dieta (10 ppm di resveratrolo) di criceto trattato con N-nitroso-bis(2-oxopropil)ammina non ha ridotto la formazione di lesioni cancerose al pancreas (Kuroiwa e altri, 2006). In un esperimento di xenotrapianto, il resveratrolo non ha arrestato la crescita di cellule umane di melanoma iniettate sotto cute in topi atimici (Niles e altri, 2006). Infine, il consumo di resveratrolo *ad libitum* nella dieta (4, 20 o 90 mg/kg p.c.) non ha interferito con il processo di cancerogenesi intestinale in topi Apc^{Min/+} (Ziegler e altri, 2004).

		days/wk)		
Mouse	s.c. implanted 4T1 breast cancer	1, 3, 5 mg/kg	i.p.	no effect on tumor growth, metastasis, body weight, organ histology, or estrous cycling
Mouse	benzo[a]pyrene (BaP)-induced sperm damage	50 /wk	s.c.	decreased DNA adducts and apoptosis
Rat	N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary tumorigenesis	10, 100 mg/kg (5 days/wk)	i.g.	no effect on body weight, decreased incidence and increased latency of tumors (100 mg/kg)
Mouse	intestinal tumor load in familial adenomatous polyposis	0.3-0.4 mg	d.w.	decreased incidence of tumors in large and small intestine, and expression of cell cycle proteins
Mouse	s.c. implanted T241 fibrosarcoma	1 mg/kg	d.w.	decreased tumor growth
Mouse	s.c. implanted Lewis lung carcinoma	0.6, 2.5, 10 mg/kg	i.p.	decreased tumor volume, weight, metastasis, and neovascularization (2.5, 10 mg/kg)
Mouse	intramuscular implanted B16-BL6 melanoma	50 mg/kg	i.p.	decreased tumor volume, no effect on body weight, mortality, or lung colonization
Rat	(AOM)-induced colorectal aberrant crypt foci (ACF)	0.2 mg/kg	d.w.	reduced number and multiplicity of ACF, increased bax, decreased p21 in normal mucosa
Mouse	lung tumorigenesis induced by a mixture of benzo[a]pyrene and 4-(methyl-nitrosoamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone	500 ppm	diet	no effect on body weight, incidence or multiplicity of tumors
Rat	innoculated Yoshida AH-130 ascites hepatoma	1 mg/kg	i.p.	25% decrease in tumor cell number, increase in G ₂ /M cells, appearance of an aneuploid peak
Mouse	DMBA initiated, TPA-promoted skin cancer	1, 5, 10, 15 μmol (twice weekly)	top.	decrease in multiplicity (98%) and incidence (88%) of skin tumors

Figura 5.31 A. Effetti protettivi del resveratrolo in studi di cancerogenesi sperimentale *in vivo*.

Species	Assay	Daily Dose	Route	Result
<i>Cancer</i>				
Hamster	N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine-induced pancreatic cancer	10 ppm	diet	no significant effect on the multiplicities of pancreatic lesions
Mouse	s.c. implanted MDA-MB-231 human breast cancer	25 mg/kg	i.p.	decreased tumor size and microvessel density, increased apoptotic index
Rat	1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis	8 mg/kg	per os	reduced tumor incidence and size, and degree of histological lesions, blocked the rise in liver TBARS and fall in colonic mucosa TBARS when given continuously
Mouse	UVB-induced skin cancer	25, 50 μ mol	top.	delayed onset and decreased incidence of tumorigenesis whether resveratrol was applied pre- or post-UVB
Rat	potential chemopreventive effects	50, 300 mg/kg	diet	increased plasma antioxidant capacity, non-significant increase in glutathione-S-transferase activity, no change in vitamin E status
Mouse	spontaneous development of mammary tumors	~ 0.2 mg/kg	d.w.	delayed tumor development, decreased size and number of tumors, lung metastases, and HER-2/neu expression, increased apoptosis
Mouse	intestinal tumor load in familial adenomatous polyposis	~ 60, 240 mg/kg	diet	decreased number of adenomas (240 mg/kg), and PGE ₂ in intestinal mucosa
Mouse	s.c. implanted human primary gastric carcinoma	500, 1000, 1500 /48 h	inj.	inhibited tumor growth, increased apoptosis
Mouse	UVB exposure	10 μ mol	top.	decreased edema, hyperplasia, leukocyte infiltration, cell cycle proteins, increased p21 and p53
Mouse	benzo[a]pyrene (BaP)-induced lung tumorigenesis	6-8 mg/kg	diet	no change in tumor incidence or multiplicity, CYP1A1 or IBI expression, or BaP protein adducts
Mouse	hepatic implanted H22 hepatoma	10, 15 mg/kg	abd.	36.3%, 49.3% reduction in tumor size, further enhanced by 5-FU
Mouse	CTX-induced micronucleus formation, DMBA/croton oil-induced skin cancer	25, 50, 100 mg/kg	gav.	decreased micronucleus formation, ODC activity, and incidence and multiplicity of papillomas, increased latency
Mouse	s.c. implanted neuro-2a neuroblastoma	40 mg/kg	i.p.	slowed growth, increased survival from 0 to 70%
Mouse	markers of proliferation and tumor development in skin following UVB exposure	10 μ mol	top.	blocked increases in proliferation (Ki-67 immunostaining), COX and ODC activity, and mRNA and phosphorylation levels of survivin
Mouse	COX and ODC activity in liver and lungs before and after NDEA treatment	2.5 mg/kg	oral	decreased ODC and COX activity, blocked induction of ODC and COX by NDEA
Mouse	intestinal tumor load in familial adenomatous polyposis	4, 20, 90 mg/kg	diet	non-significant decrease in small intestinal tumors, no effect on large intestinal tumors, decrease in PGE ₂ in tumor
Rat	s.c. and intracerebral implanted RT-2 gliomas	10, 40, 100 mg/kg	i.p.	slowed tumor growth, angiogenesis, increased apoptosis, host survival for subcutaneous and intracerebral (100 mg/kg) tumors
Mouse	UVB irradiation	25 μ mol	top.	decreased edema, leukocyte infiltration, COX and ODC activity, and oxidative damage
Rat	prepubertal MNU-induced mammary carcinomas (post-resveratrol)	10, 100 mg/kg	s.c.	10 mg/kg ineffective, 100 mg/kg increased tumor incidence
Rat	s.c. implanted AH109A hepatoma	~ 1, 5 mg/kg	diet	decreased levels of LDL, VLDL, and lipid peroxide, non-significant decrease in tumor growth
Mouse	hepatic implanted H22 hepatoma	5, 10, 15 mg/kg	abd.	decreased tumor size (10, 15 mg/kg), cyclin B1 and p34cdc2
Rat	lymphocytic DNA integrity	1-100 mg/kg	diet	increased lymphocytic DNA damage
Mouse	benzo[a]pyrene-induced lung damage	50 /wk	inj.	reduced DNA-adduct formation, CYP1A1 expression, and apoptosis
Mouse	implanted (right axilla) H22 hepatoma	500, 1000, 1500 mg/kg	i.p.	31.5%, 45.6%, 48.7% reduction in tumor size
Mouse	DMBA-induced, TPA-promoted skin cancer	1, 5, 10, 25 μ mol (twice/wk)	top.	decreased tumor formation (ED ₅₀ ~ 6 μ mol)
Rat	DMBA-induced mammary carcinogenesis	~ 12-15 mg/kg	diet	no effect on body weight, decreased incidence and multiplicity of tumors, COX-2, MMP-9, and NF κ B activity
Rat	NMBA-induced esophageal tumorigenesis	1, 2 mg/kg	per os or i.p.	reduced number and size of tumors, non-significant decrease in tumor incidence, decreased COX-1, COX-2, and PGE ₂
Mouse	foodpad or intrasplenic implanted B16M melanoma	20 (twice/day) or 23 mg/L	oral or d.w.	ineffective for solid tumor, decreased hepatic invasion, no effect on host survival
Mouse	implanted 32Dp210 myeloid leukemia	8, 40, 80 mg/kg (5	oral	non-significant increase in survival at 80 mg/kg (2/14 animals vs. 0 in other groups)

Figura 5.31 B. Effetti protettivi del resveratrolo in studi di cancerogenesi sperimentale *in vivo*.

Anche le proantocianidine estratte dai semi dell'uva si sono dimostrate in grado di prevenire *in vivo* il processo di cancerogenesi. La supplementazione della dieta animale con tali *phytochemicals* inibisce infatti la formazione di tumore epatico indotta da dimetilnitrosammina in topi B6C3F1 (Ray e altri, 2005) e la fotocancerogenesi (iniziata e promozione) indotta da raggi UVB in topi SKH-1 (Mittal e altri, 2003). Inoltre, una riduzione del 72-88% delle foci precancerose di cripte aberranti è stata registrata nel colon di ratti trattati con proantocianidine rispetto agli animali di controllo (Singletary e Meline, 2001).

Infine, l'applicazione topica di tali composti sull'epidermide di topi CD-1 iniziati con 7,12-dimetilbenzo[a]antracene ha mostrato di inibire fortemente la promozione tumorale indotta da 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (Bomser e altri, 1999).

Numerosi sembrano essere i meccanismi e le vie di traduzione del segnale coinvolte nell'effetto chemiopreventivo del resveratrolo (Kundu e Surh, 2008).

- Modulazione degli enzimi del *drug metabolism* di fase I e II. La capacità del resveratrolo di inattivare gli enzimi di fase I e/o indurre quelli di fase II è stata studiata principalmente *in vitro*. L'inibizione dell'attività dei CYP1A1, 1B1 e 1A2 da parte del *phytochemical*, infatti, è stata evidenziata in cellule di epatoma murino Hepa1c1c7 (Gerhäuser e altri, 2003), epiteliali mammarie umane MCF-10A stimulate con 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-diossina (Chen e altri, 2004b), cancerose mammarie umane MCF-7 trattate con 7,12-dimetilbenz[a]antracene e di epatoma umano HepG2 esposte al benzo[a]pirene (Ciolino e Yeh, 1999), in microsomi di insetto esprimanti i tre CYP e la NADPH citocromo P450-reduttasi ricombinanti umani e in microsomi epatici umani (Chang e altri, 2001). Alla base di tali inattivazioni vi sarebbe un'inibizione trascrizionale (Chen e altri, 2004b, Chang e altri, 2000, Ciolino e Yeh, 1999) - riscontrata anche *in vivo* (Revel e altri, 2003) - dovuta alla capacità del resveratrolo di agire come antagonista dell'AhR (Ciolino

e altri, 1998, Casper e altri, 1999). Inattivazione enzimatica è stata riscontrata *in vitro* anche per il CYP3A4 (Chan e Delucchi, 2000) e 19 (Wang e altri, 2006). L'effetto di inattivazione del resveratrolo sui CYP è stato anche confermato *in vivo* nel fegato di topo mediante analisi con *microarray* (Baur e altri, 2006). Inoltre, non solo nel fegato, ma anche nel polmone il resveratrolo si è dimostrato in grado di inattivare diversi CYP in seguito a somministrazione intraperitoneale in topi CD1 (Canistro e altri, 2009). Benché i risultati siano piuttosto scarsi, le proantocianidine, invece, non sembrano avere alcun effetto sull'attività dei CYP1A e 2E1 epatici di ratto (Singletary e Meline, 2001).

Le medesime considerazioni valgono anche per quello che riguarda gli enzimi di fase II. In letteratura, infatti, è riportato principalmente un effetto induttivo *in vitro* da parte del resveratrolo (Cao e Li, 2004, Li e altri, 2006). Tuttavia, di recente, mediante saggi con *microarray* e PCR-retro trascrizionale anche *in vivo* è stata trovata conferma dell'induzione a carico di GST, UDPGT e SULT nel ratto trattato oralmente con lo stilbene. Parallelamente è stata osservata una generalizzata regolazione negativa dei geni che codificano per enzimi di fase I (Hebbar e altri, 2005). La somministrazione intraperitoneale di resveratrolo in topi CD1 ha determinato tuttavia inattivazione della GST e dell'UDPGT nel polmone, mentre nel fegato solo quest'ultima veniva indotta (Canistro e altri, 2009). In tale fenomeno induttivo sembra essere coinvolto il fattore trascrizionale Nrf2 (Kundu e Surh, 2008). Anche sugli enzimi di fase II (GST) le proantocianidine non sembrano sortire alcun effetto nel ratto (Singletary e Meline, 2001), mentre determinano un'induzione della GST *in vitro* (Du e altri, 2007).

- Inibizione della mutagenesi. Lo stilbene riduce significativamente la formazione di addotti al DNA da parte dei metaboliti del benzo[a]pirene in topi co-trattati con resveratrolo (Revel e altri, 2003). Le stesse considerazioni valgono, *in vitro*, per la genotossicità indotta da N-idrossi-PhIP (Boyce e altri, 2004). In

cellule linfoblastoidi umane un estratto di semi di uva (89% di proantocianidine) inibisce il danno cromosomico indotto da H_2O_2 (Sugisawa e altri, 2004). Tuttavia, in presenza di ioni Cu^{2+} , il resveratrolo ha determinato rottura dell'elica del DNA in batteriofagi inattivati (Ahmad e altri, 2000). Matsuoka e altri (2001, 2002) riportano la capacità del resveratrolo di indurre aberrazioni cromosomiche, micronuclei e scambio di comatidi fratelli in cellule di criceto cinese.

- Attività antiossidante. I costituenti dell'uva mostrano attività antiossidante diretta ed indiretta. Numerosi studi riportano come il resveratrolo agisca da *scavenger* dei radicali $O_2^{\bullet-}$, HO^{\bullet} e H_2O_2 *in vitro* (Jang e altri, 1997, Martinez e Moreno, 2000, Leonard e altri, 2003, Losa, 2003) (fig. 5.32).

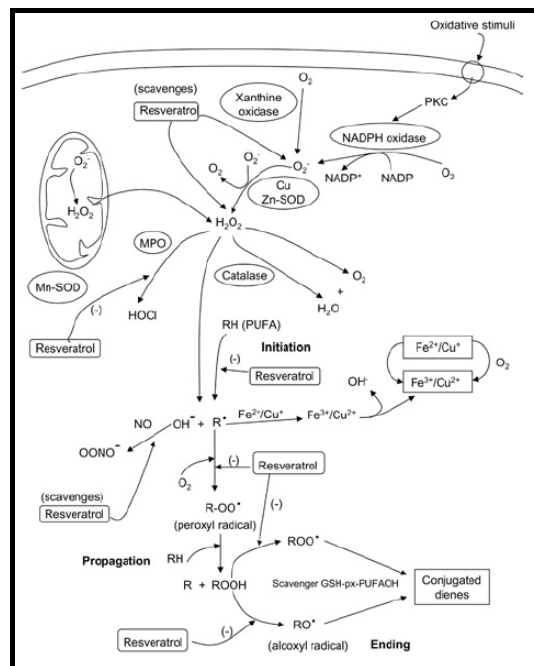


Figura 5.32. Attività antiossidante del resveratrolo (de la Lastra e Villegas, 2007).

Anche i dati sull'attività antiossidante indiretta provengono principalmente da studi condotti *in vitro*. Li e altri (2006) hanno

riportato l'induzione della SOD, catalasi, glutatione, GRx, GPx, NADPH-chinone ossidoreduttasi-1 dopo incubazione di cellule muscolari lisce aortiche di ratto con concentrazioni micromolari di resveratrolo. In cellule di feocromocitoma di ratto lo stilbene ha indotto un'aumento dell'espressione (mRNA e proteina) dell'emeossigenasi-1 e dell'attività promotoriale e dell'mRNA della glutammato-cisteina ligasi (Chen e altri, 2005). L'induzione da parte del resveratrolo dell'emeossigenasi-1 e della NADPH-chinone ossidoreduttasi-1 hanno trovato riscontro anche *in vivo*, nel maiale della Guinea (Floreani e altri, 2003) e nel ratto (Hebbar e altri, 2005). Nel fenomeno induttivo sembra essere coinvolto il fattore trascrizionale Nrf2 (Kundu e Surh, 2008).

In vitro le proantocianidine hanno mostrato un potere antiossidante contro i radicali $O_2^{\bullet-}$, HO^{\bullet} superiore di 20 e 50 volte rispetto a quello della vitamina E e C, rispettivamente (Bagchi e altri, 1997).

L'incubazione di cardiomiociti H9C2 con concentrazioni micromolari di catechina o proantocianidina B4, isolate da un'estratto di semi di uva, ha indotto in modo concentrazione dipendente gli enzimi SOD, GPx, catalasi ed i livelli di GSH. Parallelamente è stato osservato un minor accumulo di ROS indotte dalla xantina ossidasi (Du e altri, 2007). Un aumento degli enzimi antiossidanti è stato registrato anche nel cervello di ratti trattati oralmente con un'estratto di proantocianidine da semi di uva (Devi e altri, 2006).

- Inibizione della crescita cellulare. I meccanismi coinvolti sono diversi, fra questi emergono l'inibizione del metabolismo delle poliammine, il blocco del ciclo cellulare, l'induzione dell'apoptosi e del differenziamento cellulare. *In vivo* le proantocianidine inibiscono l'attività dell'ornitina decarbossilasi nel colon di ratto (Singletary e Meline, 2001) e nell'epidermide (Bomser e altri, 1999), mentre il resveratrolo ne riduce l'espressione (Afaq e altri, 2003). Complessi oligomerici di proantocianidine hanno mostrato la capacità di arrestare il ciclo cellulare in fase sub-G1 in linee prostatiche umane in seguito all'inibizione dell'espressione di cicline e chinasi ciclica-dipendenti e

alla stimolazione degli inibitori cellulari p21 e p27 (Neuwirt e altri, 2008). Meccanismi simili sono stati riscontrati per il resveratrolo in cellule umane di carcinoma epidermico (Ahmad e altri, 2001). Un estratto proantocianidinico di semi di uva si è mostrato in grado di indurre l'apoptosi in cellule umane di leucemia mieloide acuta, ma non in granulociti eosinofili e neutrofili, attraverso la stimolazione delle caspasi e la perdita del potenziale di membrana mitocondriale (Hu e Qin, 2006). In un modello di xenotrapianto, il resveratrolo ha determinato apoptosi nelle cellule tumorali gastriche (primarie) impiantate mediante l'attivazione delle caspasi, il rilascio del citocromo c, la stimolazione di Bax, l'inibizione di Bcl-2 e l'induzione della frammentazione del DNA (Zhou e altri, 2005a). Lo stilbene sembra inoltre sensibilizzare numerosi tipi di cellule cancerose, ma non fibroblasti umani sani, all'apoptosi dipendente dal *TNF-related apoptosis inducing ligand* (TRAIL) (Fulda e Debatin, 2005). Agisce inoltre in modo sinergico con quercetina ed acido ellagico nell'indurre l'apoptosi in cellule leucemiche umane (Mertens-Talcott e Percival, 2005). Il resveratrolo (Yu e altri, 2008) e le proantocianidine (Neuwirt e altri, 2008) inducono, rispettivamente, il differenziamento di linee cellulari di medulloblastoma (UW228-2 and UW228-3) e linee prostatiche umane.

- Inibizione della sintesi di DNA. Il resveratrolo inibisce in numerosi tipi cellulari la ribonucleotide reduttasi (Fontecave e altri, 1998, Horvath e altri, 2005), le DNA polimerasi di mammifero (Locatelli e altri, 2005) e la telomerasi *in vitro* (Fuggetta e altri, 2006).

- Inibizione dell'angiogenesi e del processo di metastasi. Il resveratrolo si è mostrato efficace nell'inibire il processo angiogenetico *in vivo* in un esperimento di xenotrapianto e nel ridurre i livelli extracellulari di VEGF *in vitro* (Garvin e altri, 2006). In cellule di mieloma multiplo, lo stilbene è in grado di inibire l'invasività cellulare attraverso il calo dell'espressione e dell'attività delle metalloproteinase-2 e -9 (Sun e altri, 2006). Parallelamente, un estratto di semi di uva ha inibito il processo angiogenetico *in vivo* in

un esperimento di xenotrapianto (cellule di carcinoma prostatico umano DU145) e nel ridurre i livelli extracellulari di VEGF *in vitro* (Singh e altri, 2004).

- Attività antinfiammatoria. Rispetto agli animali di controllo, il resveratrolo ha mostrato la capacità di inibire la trascrizione dei geni che codificano per la cicloossigenasi-1 e -2 e di diminuire i livelli di prostaglandina E2 in un modello di cancerogenesi esofagea indotta *in vivo* da N-nitrosometilbenzilammina in ratti F344 (Li e altri, 2002). Il trattamento con resveratrolo riduce *in vitro* l'espressione del gene codificante la NOS inducibile e la produzione di NO indotta da lipopolisaccaride (Cho e altri, 2002). In macrofagi murini stimolati da lipopolisaccaride un estratto di protoantocianidine da semi di uva ha determinato una riduzione dell'espressione della NOS inducibile (Houde e altri, 2006)

- Immunomodulazione. In un saggio di ipersensibilità ritardata il resveratrolo potenzia la risposta immunitaria di topi trattati con dinitrofluorobenzene e previene l'immunosoppressione indotta da etanolo (Feng e altri, 2002). La supplementazione della dieta animale con proantocianidine ha determinato nel topo un'inibizione dell'immunosoppressione indotta da UVB attraverso l'aumento della citochina immunostimolatoria IL-12 (Sharma e Katiyar, 2006).

- Aumento della comunicazione intercellulare. Il resveratrolo si è mostrato capace di aumentare la comunicazione intercellulare in cellule epiteliali epatiche di ratto e di prevenire la *down-regulation* delle *gap junctions* indotta da promotori tumorali (Nielsen e altri, 2000).

- Attività antiestrogene ed antiandrogena. Il resveratrolo ha mostrato attività antiestrogena in cellule tumorali mammarie umane antagonizzando lo stimolo proliferativo del 17- β -estradiolo a livello cellulare (arresto della crescita cellulare) e molecolare (inibizione della trascrizione attivata dal recettore per il progesterone) (Lu e Serrero, 1999). Nella linea cellulare LNCaP l'attività antiandrogena del resveratrolo si esplica attraverso una diminuzione della

trascrizione del recettore per gli androgeni con conseguente arresto della proliferazione cellulare e calo della trascrizione dei geni androgeno-dipendente (Mitchell e altri, 1999).

5.3.3 Gli studi epidemiologici e le meta-analisi

I dati epidemiologici riguardanti la relazione tra cancro e consumo di uva o apporto di resveratrolo sono molto limitanti. Numerosi sono invece quelli riguardanti il vino.

Uno studio epidemiologico di caso-controllo condotto in Cina riporta un'associazione inversa tra il consumo di uva e lo sviluppo di cancro naso-faringeo (Chen e Huang, 1997).

Le donne coreane in *post*-menopausa sarebbero protette dal cancro al seno grazie al consumo di elevate quantità dello stesso frutto (Do e altri, 2007). Parallelamente, uno studio di caso-controllo condotto in Svizzera ha suggerito che il resveratrolo (totale) assunto con la dieta offre protezione dallo stesso tipo di tumore: una significativa associazione inversa è stata osservata per il resveratrolo derivante dall'uva, ma non dal vino (Levi e altri, 2005).

Sempre in Cina, uno studio di caso-controllo avrebbe suggerito la capacità dell'aceto di contrastare il cancro esofageo (OR=0.37) (Xibib e altri, 2003).

Per quello che riguarda il vino, numerosissimi sono i riferimenti in letteratura. Questi ultimi mettono tutti in luce come il rischio relativo di sviluppare effetti nocivi (cancro, patologie cardio-vascolari, ecc...) nei consumatori di vino segua un andamento a "U" o "J" rispetto agli astemi (de Lorimier, 2000). Un moderato consumo di vino, infatti, è risultato associato ad una diminuzione del rischio di mortalità per tutte le cause dovuto ad una minor incidenza di cancro e patologie cardio-vascolari (Grønbaek e altri, 2000, Renaud e altri, 1999). Parallelamente, in numerosi studi epidemiologici il controllato consumo della bevanda (in particolar modo di vino rosso) è apparso inversamente associato al cancro allo stomaco (Barstad e altri, 2005), all'intestino colon-retto

(Pedersen e altri, 2003), alla pelle (Fung e altri, 2002), all'esofago (Gledovic e altri, 2007), ai reni (Greving e altri, 2007), alla prostata (Schoonen e altri, 2005) e alle ovaie (Webb e altri, 2004). L'assunzione di vino, inoltre, sembrerebbe aumentare la sopravvivenza di pazienti affetti dalla forma familiare di cancro al colon retto (Zell e altri, 2007) e proteggerebbe dal linfoma non Hodgkin (Briggs e altri, 2002). Infine, un'associazione inversa tra il consumo di vino e lo sviluppo di cancro sarebbe stata confermata anche a livello polmonare (Chao e altri, 2008). Tale dato è peraltro supportato da una meta-analisi della letteratura epidemiologica pertinente (Chao, 2007).

5.3.4 I trials clinici

Rispetto alla grande quantità di dati ottenuti *in vitro* e in svariati modelli animali, gli studi clinici sui costituenti dell'uva (resveratrolo e proantocianidine) sono molto limitati.

Un *trial* di fase I recente dimostra che l'assunzione per via orale di resveratrolo (singola somministrazione di 5 g) non causa nei soggetti (sani) arruolati alcun effetto avverso. Tuttavia, la massima concentrazione plasmatica raggiunta (2.4 $\mu\text{mol/L}$), molto inferiore a quella necessaria *in vitro* per l'attività chemiopreventiva del composto, è molto più bassa rispetto a quella dei suoi metaboliti (resveratrolo-monoglucoronidi e resveratrolo-3-solfato) (Boocock e altri, 2007).

Altri studi clinici (principalmente di fase I) sono attualmente in corso. Tra questi vi sono quelli sponsorizzati dal NCI presso *the Universities of Michigan (USA) and Leicester (UK)*, volti allo studio del profilo farmacocinetico e tossicologico del composto e dei *biomarkers* di cancerogenesi in seguito alla somministrazione singola (1, 2.5, 5,7.5 g) o ripetuta (0.5, 1, 2.5, 5,7.5 g) di resveratrolo per via orale in soggetti sani (Baur e Sinclair, 2006).

Un ulteriore *trial* clinico di fase I/II si sta svolgendo presso *the University of California, Irvine (USA)* in pazienti affetti da cancro al colon con lo scopo di valutare la capacità del resveratrolo di modulare il *signalling* di WNT, attivo in oltre l'85% dei cancri al colon (Baur e Sinclair, 2006).

Infine, in virtù della capacità del resveratrolo di potenziare *in vitro* l'effetto soppressivo degli inibitori della trascrittasi inversa, presso *the Institute for Human Virology, University of Mariland*, si sta effettuando uno studio clinico su volontari sani sieronegativi (Baur e Sinclair, 2006).

Per quello che riguarda le proantocianidine, un estratto di semi di uva è stato testato in un *trial* clinico di fase II, con risultati negativi, per valutare la sua capacità di contrastare gli effetti indesiderati associati della radioterapia (fibrosi, dolore, ecc...) in pazienti affette da cancro alla mammella (Brooker e altri, 2006).

5.4 Attività chemiopreventiva della pesca (*Prunus Persica*)

La letteratura riguardante l'attività chemiopreventiva della pesca è assai limitata. Anche in questo caso, come in quelli degli ortaggi descritti precedentemente, benché il frutto *in toto* sia estremamente ricco di differenti classi di *phytochemicals*, gli effetti salutari vengono attribuiti principalmente ad una specifica categoria di molecole: i composti polifenolici. Si tratta di una vastissima categoria di composti fitochimici distribuiti in modo ubiquitario negli alimenti, ma presenti anche in numerose specialità farmaceutiche o estratti fitoterapici e dotati di un ampio spettro di attività biologiche (Carratù e Sanzini, 2005).

5.4.1 La pesca ed i composti fitochimici

Dal punto di vista nutrizionale la pesca (*Prunus Persica*), appartenente alla famiglia delle *Rosaceae*, è un frutto poco calorico molto ricco di acqua, zuccheri semplici, sali minerali (in particolare potassio), fibre e vitamine (soprattutto quella A) (fig. 5.33).

Per quanto attiene alla specifica composizione di sostanze fitochimiche del frutto di pesco, piuttosto scarse sono le informazioni reperibili in bibliografia. Tuttavia, in collaborazione con il gruppo di ricerca del Professore Guglielmo Costa del Dipartimento di Colture Arboree dell'*Alma Mater Studiorum* - Università di Bologna, sono state eseguite analisi sul profilo fenolico dei frutti utilizzati per il presente studio, ovvero pesche nettarine appartenenti alla famiglia *Prunus Persica L.B.*. Nella figura 5.34 sono riportate le concentrazioni (mg/g di peso secco) delle principali classi di composti fenolici presenti nel liofilizzato del frutto di pesco.

Le concentrazioni medie del complesso dei composti fenolici si attestano su valori di circa 1 mg/g e 4 mg/g di peso secco nella polpa e nella buccia, rispettivamente. L'indagine analitica segnala la presenza di circa dieci composti polifenolici appartenenti alle classi degli acidi fenolici e dei flavonoidi. La classe di composti quantitativamente più influente risulta essere quella degli acidi cinnamici (acidi fenolici) che, con i due isomeri dell'acido clorogenico, costituiscono il 35 ed il 52% del totale dei composti fenolici estratti, rispettivamente da buccia e polpa del frutto. Fra i flavonoidi, invece, i flavan-3-oli (catechina, epicatechina e proantocianidine ancora non specificatamente identificate) rappresentano circa il 22-23% del totale dei fenoli in maniera del tutto simile nei due tessuti analizzati. Molto diversa è invece la situazione delle cianidine (antocianine) e dei flavonoli (glicosidici), entrambi localizzati prevalentemente nell'epicarpo del frutto.

Composizione chimica	Valore per 100g di parte edibile
Parte edibile	91%
Acqua	90,7 g
Proteine	0,8 g
Lipidi	0,1 g
Carboidrati disponibili	6,1 g
Fibra	1,6 g
Energia	27 Kcal
Sodio	3 mg
Potassio	260 mg
Ferro	0,4 mg
Calcio	4 mg
Fosforo	20 mg
Vitamina B1 (tiamina)	0,01 mg
Vitamina B2 (riboflavina)	0,03 mg
Niacina	0,5 mg
Vitamina C	4 mg
Vitamina A	27 mg

Figura 5.33. Valori nutrizionali della pesca (Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione – INRAN).

Polifenoli	Composto	Concentrazione (mg/g peso secco)	
		Buccia	Polpa
Acidi fenolici	Ac. neoclorogenico	0.32±0.10	0.21±0.07
	Ac. clorogenico	0.95±0.21	0.30±0.11
	Tot. Ac. Cinnamici	1.27±0.30	0.51±0.17
Flavonoidi	Catechina	0.43±0.07	0.11±0.05
	Epicatechina	0.15±0.03	0.06±0.02
	Procianidine	0.22±0.06	0.06±0.04
	Tot. Flavan-3-oli	0.80±0.14	0.23±0.10
	Quercetin-3-rutinoside	0.41±0.09	0.00±0.00
	Altre quercetine	0.19±0.02	0.00±0.00
	Tot. Flavonoli (glicosidici)	0.60±0.10	0.00±0.00
Cyanidin-3-O-glucoside	0.38±0.25	0.03±0.02	
	Tot. Composti fenolici	3.61±0.54	0.97±0.31

Figura 5.34. Contenuto (in mg/g peso secco) dei principali composti fenolici della pesca *Prunus Persica* (L.) Batsch “Stark Red Gold”. I valori riportati rappresentano la media ± deviazione standard delle concentrazioni di 5 campioni analizzati separatamente per buccia e polpa.

Vi è tuttavia da precisare che, benché la buccia del frutto contenga il quantitativo di composti fenolici più elevato, è dalla polpa che deriva il maggior contributo fenolico durante il consumo di una pesca. Infatti, il peso secco dei frutti analizzati è stato mediamente pari a circa il 10% del peso fresco. Con riferimento alle concentrazioni riportate in figura 5.33, la quantità per 100 grammi di tessuto fresco di composti fenolici totali è pari a circa 36 mg e 9.7 mg per buccia e polpa, rispettivamente. Per una nettarina *Stark Red Gold* del peso complessivo di 150 g, la parte edule ammonta a circa al 93% (138 g circa di peso fresco), della quale l'83% del peso è costituito dalla polpa e il rimanente 17% dalla buccia. Dalla considerazione appena riportate e dai risultati delle indagini analitiche, il consumo di una nettarina di medie dimensioni e peso consente, quindi, l'assunzione teorica di circa 20 mg di composti fenolici totali, 8 mg provenienti dalla buccia e 12 mg dalla polpa.

Le analisi condotte sono completamente in accordo con l'unico lavoro presente in letteratura sul profilo fenolico della pesca nettarina (Tomás-Barberáni e altri, 2001).

Come anticipato precedentemente, la pesca nettarina è anche un'ottima fonte di vitamine. Benché il principale composto fitochimico sia in realtà il β -carotene (e non i composti fenolici) che, esattamente come questi ultimi, è localizzato principalmente nella buccia del frutto come la vitamina C, fra i suoi tanti *phytochemicals*, solo i polifenoli sembrano essere direttamente correlati alla capacità antiossidante del frutto, (fig. 5.35) (Gil e altri, 2002).

5.4.2 I meccanismi molecolari dell'attività chemiopreventiva della pesca e dei suoi costituenti

Considerando la vastità della letteratura inerente polifenoli e cancro e la prevalenza della classe degli acidi fenolici nel frutto di pesco, è a questi ultimi che verrà dedicata maggiore attenzione nella successiva trattazione.

cultivar	fruit tissue	total phenolics (mg/kg)	total ascorbic acid (mg/kg)	β -carotene (μ g/kg)	β -cryptoxanthin (μ g/kg)	DPPH (AEAC) (mg/kg)
Red Jim	peel	1403 (285)	130 (5)	1870 (240)	240 (50)	981 (107)
	flesh	415 (75)	55 (11)	730 (160)	140 (50)	317 (45)
August Red	peel	755 (61)	118 (26)	2730 (280)	270 (20)	459 (25)
	flesh	287 (78)	58 (3)	1280 (50)	140 (30)	159 (22)
Spring Bright	peel	829 (134)	114 (12)	3070 (330)	310 (10)	471 (61)
	flesh	247 (31)	35 (5)	850 (60)	210 (20)	126 (21)
May Glo	peel	629 (73)	119 (15)	1920 (100)	250 (10)	277 (31)
	flesh	155 (17)	61 (9)	580 (50)	80 (0)	62 (3)
September Red	peel	427 (29)	78 (4)	1990 (480)	280 (90)	283 (32)
	flesh	138 (31)	53 (1)	1310 (230)	150 (60)	120 (19)

Figura 5.35. Composti fenolici totali, acido ascorbico totale, carotenoidi (β -carotene e β -criptoxantina e capacità antiossidante (metodo del DPPH) della buccia o polpa di alcune varietà di nettarine a pasta gialla (tra parentesi la deviazione standard, n=3).

Numerosi sono gli esperimenti di cancerogenesi sperimentale che mettono in luce le capacità degli acidi fenolici di contrastare il cancro, note peraltro già da tempo. Infatti, Lesca (1983) riporta la diminuzione del numero di tumori al polmone indotti da benzo [a]pirene in seguito alla somministrazione intraperitoneale di 100 mg/kg di acido ferulico e clorogenico in topi A/J. Inoltre, l'applicazione topica di acido ferulico, clorogenico o caffeico insieme al 12-O-tetradecanoilforbolo-13-acetato in topi femmina CD1 inibisce rispettivamente del 35, 60 e 28% lo sviluppo di tumori alla pelle (Huang e altri, 1988). Anche più recentemente, l'applicazione di acido caffeico ad un dosaggio di 20 μ M ha mostrato di proteggere significativamente ratti maschi NMRI dallo stesso tipo di tumore indotto da 7,12-dimetil-benzo[a]antracene (Kaul e Khanduja, 1998). Il tumore alla pelle viene ridotto anche dall'applicazione di acido caffeico fenetil estere a differenti dosaggi (1-3000 nM) in topi CD1 esposti a dimetilbenzantracene e 12-O-tetradecanoil forbolo 13-acetato (Huang e altri, 1996). La somministrazione di acidi fenolici attraverso la dieta riduce lo sviluppo di lesioni preneoplastiche e tumori alla lingua indotti da 4-nitrochinolina-1-oxide in ratti F344 (Tanaka e altri, 1993). L'incidenza di adenomi allo stomaco indotti da metil-nitrosurea risulta significativamente diminuita dalla supplementazione della dieta di

ratti F344 con acido clorogenico (500 ppm per 36 settimane) (Shimizu e altri, 1999). La supplementazione della dieta con acido ferulico diminuisce significativamente il numero di foci precancerose di cripte aberranti nel colon di ratti maschi F344 trattati con azossimetano (Kawabata e altri, 1999). Gli stessi risultati sono stati ottenuti in un esperimento simile impiegando l'acido caffeico fenetil estere (Borrelli e altri, 2002). Ratti maschi F344 trattati con acido clorogenico (250 ppm) durante la fase di iniziazione e post-iniziazione del processo di cancerogenesi sviluppano un minor numero di tumori al colon (Matsunaga e altri, 2002). Criceti maschi esposti a metilazossimetano sviluppano un minor numero di foci epatiche iperplastiche e tumori al colon quando supplementati con acido clorogenico (0.025%) (Tanaka e altri, 1990). Alcuni glicosidi estratti dai semi di pesca hanno mostrato attività anticancerogena nella pelle di topo *in vivo* (Fukuda e altri, 2003). In un esperimento di xenotrapianto, l'estratto di polpa di pesca ha mostrato la capacità di inibire significativamente la crescita di cellule CT-26 di carcinoma di colon (Lee e altri, 2009).

Altri studi hanno tuttavia messo in luce anche la possibile attività pro-cancerogena degli acidi fenolici. La somministrazione di acido clorogenico alla dose di 70 mg/kg a ratti Sprague-Dawley esposti ad azossimetano ha determinato un aumento del numero di foci precancerose di cripte aberranti nel colon (Exon e altri, 1998). L'acido caffeico somministrato attraverso la dieta (0.4%) incrementa il numero di papillomi nello stomaco in ratti maschi F344 multi-iniziati (Hirose e altri, 1998) o ne determina la formazione quando somministrato allo stesso modello animale (2% della dieta) (Kaneko e altri, 2002). La somministrazione di acido caffeico a quest'ultimo dosaggio ha inoltre indotto iperpalsia delle cellule dei tubuli renali in ratti maschi e topi femmina (Hagiwara e altri, 1991). Questi studi hanno quindi messo in luce il comportamento ormetico dell'acido caffeico nell'ambito del processo di cancerogenesi: è un cancerogeno quando somministrato al 2% (Hagiwara e altri, 1991), agisce da

promotore tumorale allo 0.5-1% (Hirose e altri, 1991 e 1992) e da anticancerogeno allo 0.05-0.5% (Tanaka e altri, 1993).

Numerosi meccanismi sembrano essere coinvolti nell'attività anticancerogena dei composti polifenolici.

- Modulazione degli enzimi del *drug metabolism* di fase I e II. In generale, tutti i polifenoli sono in grado di inibire l'attività di numerose isoforme di citocromo P450. Tale capacità è stata dimostrata per gli acidi fenolici sia *in vivo* (Szaefer e altri, 2008) che *in vitro* (Teel e Huynh, 1998; Baer-Dubowska e altri, 1998; Huynh e Teel, 2002), ma le medesime considerazioni valgono anche per i flavonoidi (Moon e altri, 2006). Per ciò che riguarda gli enzimi di fase II l'effetto esercitato è induttivo (Kawabata e altri, 1999; van der Logt e altri, 2003; Szaefer e altri, 2004), ma a tale *trend* fanno eccezione le SULT che vengono invece inattivate (Yeh e Yen, 2003; Moon e altri, 2006).

- Inibizione della mutagenesi. L'acido clorogenico inibisce la formazione dell'addotto al DNA 8-idrossideossiguanosina *in vitro* ed *in vivo* nel ratto (Kasai e altri, 2000). L'acido caffeico inibisce le mutazioni indotte dall'aflatossina B₁ nel test di Ames (Karekar e altri, 2000).

- Attività antiossidante. I polifenoli mostrano attività antiossidante diretta ed indiretta. *In vitro*, infatti, agiscono inattivando numerosi tipi di ROS e chelando gli ioni metallici divalenti, riducendo in questo modo il loro potenziale ossidativo (Haslam e altri, 1998). In particolare l'acido clorogenico *in vitro* agisce da *scavenger* di radicali O₂^{•-} generati dalla xantina ossidasi (Chun e altri, 2003) e HO[•] (Zang e altri, 2003). Gli acidi indrossicinnamici sono tuttavia in grado di agire da antiossidanti anche *in vivo*: proteggono infatti le lipoproteine a bassa densità dall'ossidazione (Castelluccio e altri, 1996). Il succo di pesca esibisce forte potere antiossidante nel plasma umano *in vivo* (Ko e altri, 2005). L'attività antiossidante indiretta dei polifenoli si manifesta attraverso inattivazioni ed induzioni metaboliche. L'acido caffeico e cumarico, per esempio, inibiscono l'attività della xantina

ossidasi *in vitro* (Chan e altri, 1995), enzima notoriamente in grado di rilasciare ROS durante la sua attività catalitica. L'acido ferulico somministrato alla dose di 100 mg/kg a ratti maschi F344 determina una significativa induzione della NADPH chinone ossido-reduttasi 1 (Kawabata e altri, 1999). Lo stesso enzima viene indotto *in vivo* nell'epidermide di topo dagli acidi clorogenici, tannico e protocatecuico (Szaefer e altri, 2008). L'acido p-cumarico (10 mg/kg) induce la superossido dismutasi e la catalasi nel muscolo cardiaco di ratto (Abdel-Wahab e altri, 2003). I flavonoidi inducono *in vivo* ed *in vitro* l'attività e/o l'espressione dell'mRNA della NADPH chinone ossido-reduttasi (Moon e altri, 2006). In un modello animale di ischemia cerebrale, il pretrattamento per via orale dei ratti con isoliquiritigenina riduce il danno indotto da ri-perfusione grazie al mantenimento dell'attività della superossido dismutasi, catalasi e glutatione perossidasi, che solitamente diminuiscono (Zhan e altri, 2006).

- Inibizione della crescita cellulare. I meccanismi coinvolti sono diversi. Fra questi emergono l'inibizione del metabolismo delle poliammine, il blocco del ciclo cellulare, l'induzione dell'apoptosi e del differenziamento cellulare. L'applicazione topica di acido clorogenico inibisce l'attività dell'ornitina decarbossilasi nell'epidermide di topi femmina CD1 (Huang e altri, 1988). Quest'ultima viene inattivata anche *in vitro* da differenti esteri dell'acido caffeico (Rao e altri, 1992). L'epigallocatechina gallato è in grado di bloccare il ciclo cellulare di cellule cancerose mammarie MCF7 in fase G0/G1 attraverso l'ipofosforilazione di pRb e l'overespressione delle CDK p21 e p27, mentre in cellule di carcinoma prostatico l'arresto della crescita cellulare viene indotto da un aumento dell'espressione di p53 ed un'induzione di p21 (Lambert e Yang, 2003). L'acido clorogenico induce apoptosi in modo dose-dipendente in cellule di carcinoma squamoso del cavo orale ed in linee cellulari tumorali di ghiandole salivari umane (Jiang e altri, 2001). L'acido caffeico induce apoptosi in cellule cancerose mammarie

umane attivando fattori pro-apoptotici come Fas, Bax e le caspasi (Watabe e altri, 2004). L'estratto di pesca è in grado di indurre il differenziamento di cellule cancerose umane di colon CaCo2 (Lea e altri, 2008). L'attività antiproliferativa della pesca si manifesta anche in cellule cancerose epatiche umane HepG(2) (Sun e altri, 2002).

- Inibizione dell'angiogenesi e del processo di metastasi. L'acido caffeico fenetil estere inibisce la motilità di cellule A549 di adenocarcinoma polmonare indotta dal *transforming growth factor-beta* (Shigeoka e altri, 2004). La somministrazione intraperitoneale dello stesso composto (10 mg/kg/giorno) a topi BALB/c riduce la capacità metastatica di cellule CT26 grazie alla diminuzione dei livelli plasmatici di VEGF (Liao e altri, 2003).

- Attività antinfiammatoria. L'acido caffeico fenetil estere è in grado di inibire *in vitro* l'attività della 5-lipoossigenasi (Sud'ina e altri, 1993). Lo stesso composto inibisce l'attività della NOS, enzima coinvolto nel danneggiamento tissutale mediato da infiammazione ed autoimmunità (Song e altri, 2002).

- Immunomodulazione. L'acido clorogenico, ferulico e cumarico aumentano l'attività e la proliferazione di linfociti umani e la secrezione di IFN- γ *in vitro* (Chiang e altri, 2003). L'acido caffeico fenetil estere è in grado di aumentare la suscettibilità delle cellule tumorali all'attacco delle cellule *natural killer* e di indurre l'espressione di antigeni tumorali in linee cellulari umane di melanoma e di cervello (Ghoneum e altri, 1995).

- Aumento della comunicazione intercellulare. L'epicatechina ha effetti stimolatori sulle *gap junctions* delle cellule epiteliali epatiche di ratto WB-F344 esposte al promotore tumorale 12-O-tetradecanoilforbolo-13-acetato (Ale-Agha e altri, 2002). Anche l'acido caffeico fenetil estere ha mostrato la stessa capacità sulle cellule WB-ras2, caratterizzate da un sistema di comunicazione intercellulare deficitario (Na e altri, 2000).

- Chemiosensibilizzazione. In un esperimento di xenotrapianto, la somministrazione di estratto di polpa di pesca aumenta l'effetto

inibitorio del cisplatino sulla crescita tumorale e ne attenua la nefrotossicità (Lee e altri, 2009). In un esperimento simile, il medesimo estratto ha mostrato la capacità di contrastare anche l'epatotossicità del cisplatino (Lee e altri, 2008).

- Inibizione dell'attivazione e del *signalling* degli androgeni. In uno studio delle relazione struttura-attività, l'acido caffeico fenetil estere ha mostrato la potenziale capacità di inibire la 5- α -reduttasi (Hiipakka e altri, 2002), enzima responsabile della conversione del testosterone in 5- α -idrossitestosterone. Quest'ultimo è responsabile della crescita fisiologica e iperplastica della ghiandola prostatica.

- Inibizione dei *pathways* mediati dai recettori per i fattori di crescita. L'epicatechina gallato è in grado di bloccare il legame dell'*epidermal growth factor* al suo recettore in cellule di carcinoma di epidermide A431 (Liang e altri, 1999), inibire l'autofosforilazione del recettore per *epidermal growth factor* in cellule di carcinoma della testa e del collo YCU-N861 e YCU-H891 (Masuda e altri, 2001) e nella linea cellulare di carcinoma mammario MDA-MB-231 (Masuda e altri, 2002), di inibire l'attività a tirosina chinasi *in vitro* (Liang e altri, 1997).

- Effetti sul DNA. L'epigallocatechina gallato è in grado di inibire le DNA metiltransferasi e, di conseguenza, di riattivare l'espressione del *gene tumor suppressor p16 in vitro* (Fang e altri, 2003). Lo stesso composto inibisce la topoisomerasi I in numerose linee cellulari umane di cancro al colon (Berger e altri, 2001). L'epicatechina, la quercetina e l'epigallocatechina gallato hanno la capacità di inibire la telomerasi sia *in vitro* che in esperimenti di xenotrapianto (Naasani e altri, 2003).

5.4.3 Gli studi epidemiologici

Attualmente esistono solamente due studi epidemiologici riguardanti la pesca. Il primo, di caso-controllo, è stato condotto in Cina ed evidenzia una riduzione del rischio di cancro al cavo orale associata al

consumo delle pesche (Zheng e altri, 1993). Il secondo è invece uno studio di coorte realizzato negli Stati Uniti dal quale emerge un'associazione inversa tra il consumo di pesche e nettarine e il rischio di cancro alla testa e al collo (Freedman e altri, 2008). Più abbondante, anche se ancora limitata, è la letteratura epidemiologica dedicata ai polifenoli. Quest'ultima riguarda principalmente i flavonoidi che, insieme agli acidi fenolici (per i quali attualmente non sono stati ancora condotti studi di questo tipo), sono i composti che più frequentemente ricorrono nei cibi indagati per le loro proprietà chemiopreventive (Yang e altri, 2001b). Gli studi finora condotti mettono in luce un modesto effetto chemiopreventivo dei flavonoidi, imputabile al numero limitato di studi condotti ed alle scarse informazioni riguardanti l'assunzione giornaliera (il primo database riguardante il contenuto di flavonoidi in alcuni cibi è stato pubblicato solo nel 2003) e la biodisponibilità di questa classe di composti. Di seguito ne viene offerta una rassegna che mette in luce un probabile effetto sul cancro ai polmoni (fig. 5.36) (Neuhouser, 2004).

5.4.4 I trials clinici

I composti polifenolici sono stati oggetto di numerosissime indagini cliniche, soprattutto quelli del tè verde e/o nero e della soia. Gli studi sono stati condotti in pazienti affetti da cancro, in stadio premaligno e in volontari sani. In questi, l'esposizione ai polifenoli ha mostrato la capacità di aumentare l'attività antiossidante del plasma e delle urine e di proteggere il DNA dal danno indotto dal fumo e dalle radiazioni. Nei pazienti in stadio premaligno, invece, i risultati si sono mostrati ambigui: mentre in un trial è stato addirittura registrata una diminuzione della progressione del cancro alla prostata, in un altro studio si è osservato un aumento della proliferazione cellulare in pazienti affetti da polipi colonrettali.

Location	Subjects	Cancer	Exposure	Odds Ratio (95% CI) ^a	P Trend
The Netherlands	738 elderly men 75 cases	Any cancer	Total flavonoids ^b	0.57 (0.31, 1.08) ^c	0.08
Finland	27,110 male smokers	Lung	Total flavonoids ^b	0.56 (0.45, 0.69) ^d	<0.001
		Urothelial		1.2 (0.73, 1.8) ^d	0.77
		Renal		0.63 (0.36, 1.1) ^d	0.10
		Prostate		1.3 (0.87, 1.8) ^d	0.24
		Colorectal		1.7 (1.0, 2.7) ^d	0.10
The Netherlands	728 elderly men 96 cases	Epithelial cancer ^e	Catechin	0.94 (0.56, 1.59) ^f	0.82
Iowa	34,651 postmenopausal women	Upper digestive	Catechin	0.71 (0.46, 1.11) ^g	0.31
		Colon		1.10 (0.85, 1.44) ^g	0.63
		Rectum		0.55 (0.32, 0.95) ^g	0.02
		Lung		0.94 (0.72, 1.23) ^g	0.94
		Breast		1.04 (0.84, 1.28) ^{g,h}	1.0
		Uterus		1.00 (0.73, 1.36) ^{g,h}	0.54
		Ovary		0.73 (0.44, 1.24) ^{g,h}	0.21
		Pancreas		0.74 (0.46, 1.20) ^g	0.77
		Kidney		0.73 (0.40, 1.32) ^g	0.12
		Bladder		1.12 (0.65, 1.93) ^g	0.93
Finland	9,865 adult males and females	Stomach	Quercetin	1.03 (0.52, 2.07) ⁱ	0.82
			Kaempferol	1.14 (0.59, 2.22) ⁱ	0.98
			Myricetin	1.16 (0.59, 2.26) ⁱ	0.29
			Hesperetin	0.88 (0.43, 1.80) ⁱ	0.67
			Naringenin	0.94 (0.47, 1.88) ⁱ	0.67
			Quercetin	0.62 (0.33, 1.17) ⁱ	0.22
		Colorectal	Kaempferol	1.13 (0.60, 2.12) ⁱ	0.96
			Myricetin	1.31 (0.71, 2.43) ⁱ	0.39
			Hesperetin	0.97 (0.50, 1.90) ⁱ	0.84
			Naringenin	0.93 (0.48, 1.82) ⁱ	0.95
			Quercetin	0.87 (0.44, 1.72) ⁱ	0.49
			Kaempferol	0.67 (0.34, 1.31) ⁱ	0.11
		Urinary organs	Myricetin	0.78 (0.41, 1.49) ⁱ	0.23
			Hesperetin	0.83 (0.40, 1.70) ⁱ	0.94
			Naringenin	0.81 (0.39, 1.66) ⁱ	0.90
			Quercetin	0.42 (0.25, 0.72) ⁱ	0.001
			Kaempferol	0.81 (0.51, 1.28) ⁱ	0.26
			Myricetin	1.20 (0.78, 1.83) ⁱ	0.98
		Lung	Hesperetin	0.74 (0.46, 1.18) ⁱ	0.07
			Naringenin	0.64 (0.39, 1.04) ⁱ	0.02
			Quercetin	0.76 (0.40, 1.42) ⁱ	0.35
			Kaempferol	1.03 (0.53, 2.02) ⁱ	0.54
			Myricetin	0.43 (0.22, 0.86) ⁱ	0.002
			Hesperetin	1.47 (0.80, 2.71) ⁱ	0.26
Prostate	Naringenin	1.48 (0.80, 2.73) ⁱ	0.27		
	Quercetin	0.62 (0.37, 1.03) ⁱ	0.25		
	Kaempferol	0.87 (0.53, 1.41) ⁱ	0.70		
	Myricetin	0.95 (0.57, 1.60) ⁱ	0.63		
	Hesperetin	1.08 (0.63, 1.86) ⁱ	0.93		
	Naringenin	1.14 (0.67, 1.94) ⁱ	0.82		
Breast	Quercetin	0.62 (0.37, 1.03) ⁱ	0.25		
	Kaempferol	0.87 (0.53, 1.41) ⁱ	0.70		
	Myricetin	0.95 (0.57, 1.60) ⁱ	0.63		
	Hesperetin	1.08 (0.63, 1.86) ⁱ	0.93		
	Naringenin	1.14 (0.67, 1.94) ⁱ	0.82		
	Quercetin	0.62 (0.37, 1.03) ⁱ	0.25		

a: Relative risks are for highest relative to lowest quantile of intake.
b: Sum of quercetin, kaempferol, myricetin, luteolin, and apigenin.
c: Adjusted for age, smoking, body mass index, physical activity, and intake of energy, alcohol, vitamin C, β-carotene, vitamin E, and fiber.
d: Relative risks for lung cancer are adjusted for age, trial arm (study vitamins vs. placebo), and smoking. Relative risks for prostate, colorectal, and stomach cancer are adjusted for age and trial arm only.
e: Includes cancers of the oropharynx, esophagus, stomach, colon, rectum, liver, gallbladder, pancreas, kidney, bladder, and lung.
f: Adjusted for age, physical activity, total energy, alcohol, smoking, body mass index, and intake of coffee, fiber, vitamin C, vitamin E, and β-carotene.
g: Adjusted for age, body mass index, waist-hip ratio, physical activity, smoking, and intake of energy, alcohol, and fruits and vegetables.
h: Relative risks for breast, ovary, and uterus cancer exclude women with baseline mastectomy, hysterectomy, or oophorectomy, leaving 21,502 for analysis. Additional adjustments for use of estrogen replacement therapy, age at menarche, age at menopause, and age at first pregnancy.
i: Adjusted for age, sex, geographic area, occupation, smoking, and body mass index.

Figura. 5.36 A. Studi di coorte sul rischio di cancro ed i flavonoidi.

Location	Subjects	Cancer	Exposure	Odds Ratio (95% CI) ^a	<i>P</i> Trend
Spain	103 cases and 206 hospital controls	Lung	Quercetin	1.89 (0.72, 4.92) ^b	0.19
			Kaempferol	0.51 (0.22, 1.17) ^b	0.10
			Luteolin	0.59 (0.24, 1.43) ^b	0.40
Uruguay	541 cases and 540 hospital controls	Lung	Total flavonoids	0.59 (0.40, 0.87) ^c	0.01
			Quercetin	0.58 (0.39, 0.85) ^c	0.0007
			Kaempferol	0.79 (0.55, 1.17) ^c	0.16
Spain	497 cases and 547 neighborhood controls + 566 hospital controls	Bladder	Quercetin	1.21 (0.8, 1.9)	0.94
			Kaempferol	1.35 (0.9, 2.1)	0.11
			Luteolin	0.95 (0.6, 1.4)	0.40
			Myricetin	0.82 (0.6, 1.2)	0.20
Spain	354 cases and 354 hospital controls	Stomach	Quercetin	0.62 (0.35, 1.10) ^d	0.02
			Kaempferol	0.48 (0.26, 0.88) ^d	0.04
			Myricetin	1.12 (0.67, 1.85) ^d	0.45
Hawaii	582 cases selected from the Hawaii SEER ^e Cancer Registry and 582 population controls	Lung	Quercetin	0.7 (0.4, 1.1) ^f	0.07
			Kaempferol	0.9 (0.5, 1.4) ^f	0.41
			Myricetin	1.0 (0.6, 1.6) ^f	0.42
			Hesperetin	1.2 (0.7, 2.0) ^f	0.54
			Naringenin	0.7 (0.5, 1.1) ^f	0.17
Greece	820 cases and 1,548 hospital controls	Breast	Flavonones	0.96 (0.87, 1.07) ^g	
			Flavan-3-ols	0.93 (0.78, 1.11) ^g	
			Flavonols	0.91 (0.78, 1.06) ^g	

a: Odds Ratios are for the highest compared with the lowest quantile of intake.
b: Adjusted for intake of vitamin E, vitamin C, total carotenoids, and each of the other flavonoids.
c: Adjusted for age, education, family history of lung cancer, body mass index, smoking, total energy, and total fat intake.
d: Adjusted for intake of total energy, nitrites, nitrosamines, vitamin C, total carotenoids, and each of the other flavonoids.
e: Surveillance, Epidemiology and End Results is a cancer registry program of the National Cancer Institute.
f: Adjusted for smoking and intake of β -carotene and saturated fat.
g: Odds ratios are per 1 SD increase in intake of the compound per day. Adjusted for age, place of birth, age at first pregnancy, age at menarche, menopausal status, body mass index, fruit and vegetable consumption, and other flavonoids. Authors did not break down the classes into specific flavonoid compounds. Readers are referred to Table 1.

Figura. 5.36 B. Studi di caso-controllo sul rischio di cancro ed i flavonoidi.

Anche nei pazienti affetti da cancro sono stati registrati alcuni benefici come una diminuzione dei livelli del PSA in pazienti affetti da cancro alla prostata o una riduzione dei livelli di addotti al DNA in tessuti di tumore colon-rettale (fig. 5.37 A, B eC) (Thomasset e altri, 2007).

Type of polyphenol	Biomarkers	Numbers recruited	Maximal length of treatment	Maximum daily dose of polyphenol and method of administration	Chemopreventive outcome
Green tea ¹⁴	DNA damage	52	6 months	3 cups, ¹ beverage	↓ DNA damage (leukocytes)
Green tea ¹⁵	DNA damage	10	1 dose	3 cups, ¹ beverage	↓ DNA damage (leukocytes)
Green tea ¹⁶	DNA damage	6	1 dose	4 mg/2.5 cm ² , topical	↓ DNA damage (skin)
Green tea, black tea ¹⁷	DNA damage	143	4 months	583 mg green tea polyphenols/ 447 mg black tea polyphenols, beverage	↓ DNA damage with green tea (urine)
Green tea ¹⁸	DNA damage, DNA content, apoptosis	6	1 month	798 mg catechins, beverage	↓ DNA damage, ↑ diploid DNA, ↑ apoptosis (oral cytology)
Green tea ¹⁹	DNA damage, free radicals	67	1 week	3 cups, ¹ beverage	↓ DNA damage (leukocytes, urine), ↓ free radical generation (urine)
Green tea ²⁰	DNA damage, oxidation status	16	3 weeks	18.6 mg catechins, prepared diet	↔ DNA damage (urine), ↑ antioxidant activity (plasma)
Green tea ²¹	DNA damage, oxidation status	20	2 doses ²	1 g Polyphenon E/580 mg EGCG, oral capsules	↔ DNA damage (leukocytes), ↑ antioxidant activity (plasma)
Green tea ²²	Oxidation status	6	1 dose	1 mg EGCG/ cm ² , topical	↑ antioxidant activity (skin)
Green tea ²³	Oxidation status	12	1 dose	1 cup, ¹ beverage	↑ antioxidant activity (plasma and urine)
Green tea ²⁴	Oxidation status	10	3 doses ²	1 cup, ¹ beverage	↑ antioxidant activity (plasma)
Green tea, black tea ²⁵	Oxidation status	30	3 doses ²	697 mg green tea flavanols/547 mg black tea flavanols, beverage 462 mg green tea flavanols, oral capsule	↑ antioxidant activity with green tea capsules (plasma)
Green tea, black tea ²⁶	Oxidation status	24	2 doses	640 mg green tea catechins/140 mg black tea catechins, beverage	↑ antioxidant activity (plasma)
Black tea ²⁷	Oxidation status	9	2 doses	6 cups, ¹ beverage	↑ antioxidant activity (plasma)
Green tea ²⁸	COX-2	9	1 dose	1 mg extract/ cm ² , ¹ topical	↓ COX-2 (skin)
Green tea ²⁹	COX-2, apoptosis	15	1 dose	180 mg polyphenols, beverage	↓ PGE ₂ , ↔ apoptosis (rectum)
Soy ³⁰	Mammographic density	220	24 months	50 mg isoflavones, prepared diet	↔ mammographic density
Soy ³¹	Mammographic density	34	12 months	100 mg isoflavones, oral tablets	↔ mammographic density
Soy ³²	Sex hormones and metabolites	26	2 months	40 mg isoflavones, prepared diet	↔ sex hormones and metabolites (serum and urine)
Soy ³³	Sex hormones	35	2 months	90 mg isoflavones, beverage	↓ estrone, ↔ estradiol, testosterone, SHBG (serum)
Soy ³⁴	PSA	128	12 months	83 mg isoflavones, beverage	↔ PSA (serum)
Soy ³⁵	PDGF	23	9 days	Soy, ¹ prepared diet	↑ PDGF (serum)
Red clover ³⁶	Mammographic density, sex hormones	205	12 months	42.5 mg isoflavones, oral tablet	↔ mammographic density, sex hormones (serum)
Quercetin ³⁷	DNA damage	42	2 weeks	91.1 mg quercetin, prepared diet	↔ DNA damage (leukocytes)

EGCG, epigallocatechin-3-gallate; COX-2, cyclooxygenase-2; PGE₂, prostaglandin E₂; SHBG, sex hormone-binding globulin; PSA, prostate specific antigen; PDGF, platelet derived growth factor. ↑ increase, ↓ decrease, ↔ unchanged.
¹Dose of polyphenol unknown, ²Weekly dosing.

Figura 5.37 A. Studi clinici condotti su volontari sani.

Type of polyphenol and cancer	Participants	Numbers recruited	Maximal length of treatment (months)	Maximum daily dose of polyphenol and method of administration	Chemopreventive outcome
Green tea, prostate cancer ³⁸	Prostate intra-epithelial neoplasia	60	12	600 mg catechins, oral capsules	↓ progression to prostate cancer (histology), ↔ PSA (serum)
Green tea, oral cancer ³⁹	Oral leukoplakia	64	6	1.2 g polyphenols, oral capsules and tea in glycerine, topical	↑ rate of partial regression (clinically), ↓ DNA damage, ↓ proliferation (oral mucosa)
Green tea, hepatocellular carcinoma ⁴⁰	High risk for hepatocellular carcinoma	124	3	1g polyphenols, oral capsules	↓ DNA damage (urine)
Green tea, cervical cancer ⁴¹	Chronic cervicitis, cervical intra-epithelial neoplasia	88	3	200 mg Polyphenon E or EGCG, oral capsules or Polyphenon E, topical	↓ HPV DNA (cervical lesion), improvement in histology/cytology
Green tea, skin cancer ⁴²	Actinic keratoses	51	3	0.5 ml EGCG 5.5–8.5%, topical	↔ proliferation, cellular morphology, cell cycle regulation (skin lesion)
Black tea, oral cancer ⁴³	Oral leukoplakia	82	12	3 cups black tea, ¹ beverage	↓ DNA damage (oral mucosa)
Curcumin, high-risk or premalignant lesions ⁴⁴	Recently resected bladder cancer, oral leukoplakia, intestinal metaplasia of the stomach, cervical intra-epithelial neoplasia, Bowen's disease	25	3	8 g curcumin, oral capsules	Histological improvement in 7 patients, 2 developed malignancy
Soy, colorectal cancer ⁴⁵	Colorectal polyps	150	12	83 mg isoflavones, beverage	↑ cell proliferation (sigmoid colon and caecum)

PSA, prostate specific antigen; EGCG, epigallocatechin-3-gallate; HPV, human papilloma virus. ↑ increase, ↓ decrease, ↔ unchanged.
¹Dose of polyphenol unknown.

Figura 5.37 B. Studi clinici condotti su pazienti allo stadio premaligno.

Type of polyphenol and cancer	Participants	Numbers recruited	Maximal length of treatment	Maximum daily dose of polyphenol and method of administration	Chemopreventive outcome
Green tea, prostate cancer ⁴⁶	Advanced prostate cancer	54	5 months	6 cups, ¹ beverage	↓ ≥ 50% of baseline PSA value in 1 participant
Green tea, prostate cancer ⁴⁷	Hormone refractory prostate cancer	19	5 months	375 mg polyphenols, oral capsules	Disease progression in all participants (PSA/ imaging)
Green tea, lung cancer ⁴⁸	Advanced lung cancer	17	16 weeks	2.7 g/m ² polyphenols, oral capsules	Disease progression in all participants (clinically/ imaging)
Green tea, solid tumours ⁴⁹	Non-small cell lung cancer, head and neck cancer, mesothelioma, thymoma	49	6 months	3.7 g catechins, oral capsules	Disease progression in all participants (imaging)
Curcumin, colorectal cancer ⁵⁰	Advanced colorectal cancer	15	4 months	3.6 g curcumin, oral capsules	↓ inducible PGE ₂ , ↔ GST and M ₁ G (leukocytes) 1 participant exhibited stable disease for 4 months (imaging)
Curcumin, colorectal cancer ⁵¹	Advanced colorectal cancer	15	4 months	180 mg curcumin, oral capsules	↓ GST activity, ↔ M ₁ G (leukocytes) 2 participants exhibited stable disease for 4 months (imaging)
Curcumin, colorectal cancer ⁵²	Advanced colorectal cancer	15	29 days	180 mg curcumin, oral capsules	↓ inducible PGE ₂ (leukocytes)
Curcumin, colorectal cancer ⁵³	Operable colorectal cancer	12	7 days	3.6 g curcumin, oral capsules	↓ M ₁ G, ↔ COX-2 (malignant colorectal tissue)
Curcumin, colorectal liver metastases ⁵⁴	Operable colorectal liver metastases	12	7 days	3.6 g curcumin, oral capsules	↑ M ₁ G (normal and malignant liver tissue)
Soy, prostate cancer ⁵⁵	Prostate cancer Gleason grade ≤6	76	12 weeks	60 mg isoflavones, beverage	↔ PSA, testosterone, estradiol, SHBG (serum)
Soy, prostate cancer ⁵⁶	Advanced prostate cancer	20	84 days	898 mg isoflavones, oral capsules	↓ dehydroepiandrosterone (serum), ↔ PSA, testosterone, LH
Soy, prostate cancer ⁵⁷	Advanced prostate cancer	20	12 weeks	600 mg isoflavones, oral capsules	↔ DNA damage (leukocytes)
Soy, prostate cancer ⁵⁸	History of prostate cancer, elevated PSA levels	19	45 months	121 mg isoflavones, beverage	↑ PSA doubling time and time to progression (PSA/ imaging)
Soy, prostate cancer ⁵⁹	History of prostate cancer, elevated PSA levels	62	6 months	900 mg isoflavones, oral capsules	↓ ≥ 50% of baseline PSA value in 1 participant
Soy, prostate cancer ⁶⁰	Prostate cancer prior to radical prostatectomy	32	31 days	117 mg isoflavones, manufactured bread	↓ total PSA, ↑ free/total PSA ratio
Soy, solid tumours ⁶¹	Advanced prostate cancer, advanced colorectal cancer	13	2 doses ²	8mg/kg isoflavones, oral capsules	↑ tyrosine phosphorylation (leukocytes)
Soy, breast cancer ⁶²	Operable breast cancer	17	2 weeks	200 mg isoflavones, oral tablet	↔ apoptosis/mitosis ratio
Soy, breast cancer ⁶³	Post treatment for breast cancer	7	5 days	138 mg isoflavones, oral capsules	↑ superoxide dismutase activity (erythrocytes), ↔ 8-OHdG (urine), ceruloplasmin (plasma)
Red clover, prostate cancer ⁶⁴	Prostate cancer prior to radical prostatectomy	38	54 days	160 mg isoflavones, oral capsules	↑ apoptosis (prostatectomy specimens), ↔ PSA, testosterone (serum), Gleason score (prostatectomy specimens)
Quercetin, solid tumours ⁶⁵	Advanced gastrointestinal cancers, ovarian cancer, melanoma, nonsmall cell lung cancer, renal carcinoma	51	Unknown ³	2000 mg/m ² quercetin, intravenous infusion	↓ tyrosine kinase activity (leukocytes), ↔ tumour (imaging)

PSA, prostate specific antigen; PGE₂, prostaglandin E₂; GST, glutathione S-transferase; M₁G, malondialdehyde-DNA; COX-2, cyclooxygenase-2; SHBG, sex hormone-binding globulin; LH, lutenising hormone; 8-OHdG, 8-hydroxyguanosine. ↑ increase, ↓ decrease, ↔ unchanged.
¹Exact dose of polyphenol unknown. ²Weekly dosing. ³Weekly or 3-weekly dosing.

Figura 5.37 C. Studi clinici condotti su pazienti affetti da cancro.

5.5 Attività chemiopreventiva della lattuga (*Lactuca Sativa*)

Contrariamente ai vegetali sopra descritti, la lattuga, scelta in questo studio in rappresentanza di un ortaggio di colore verde principalmente per il suo elevato e mondiale consumato abituale, non viene

attualmente identificata in letteratura come fonte di alcun composto fitochimico specifico, benché ne sia ricca. Manca di conseguenza qualunque riferimento alla sua attività chemiopreventiva, fatta eccezione per la capacità di aumentare *in vivo* nell'uomo la concentrazione plasmatica di *phytochemicals* come quercetina, acido cumarico e caffeico, β -carotene, vitamina C e la capacità antiossidante totale del plasma in seguito all'ingestione dell'ortaggio fresco (Serafini e altri, 2002). Lo stesso risultato è stato ottenuto, sempre *in vivo*, anche nel ratto (Nicolle e altri, 2004). Nello stesso modello animale un estratto di semi di lattuga ha mostrato anche capacità antinfiammatorie (Sayyah e altri, 2004). Infine, il succo ed un estratto di tale ortaggio si sono dimostrati anti-mutageni *in vitro* (Edenharder e altri, 1994) ed *in vivo* (Pèrez e Gago, 1991), rispettivamente.

In passato venivano attribuiti a questo ortaggio proprietà calmanti, rinfrescanti e stimolanti dell'appetito. Attualmente, per via del suo elevato contenuto di fibre, è nota principalmente la capacità di favorire il transito intestinale.

5.5.1 La lattuga ed i composti fitochimici

La lattuga è un ortaggio particolarmente ricco di acqua e sali minerali. In figura 5.38 è riportata la composizione chimica dell'ortaggio stimata dall'INRAN.

Composizione chimica	Valore per 100g di parte edibile
Parte edibile	80%
Acqua	90,3 g
Proteine	1,8 g
Lipidi	0,4 g
Carboidrati	2,2 g
Fibra	1,5 g
Sodio	9 mg

Potassio	240 mg
Ferro	0,8 mg
Calcio	4,5 mg
Fosforo	31 mg
Vitamina B1 (tiamina)	0,05 mg
Vitamina B2 (riboflavina)	0,18 mg
Vitamina B3 (niacina)	0,70 mg
Vitamina C	6 mg
Vitamina A (ret. eq.)	229 µg

Figura 5.38. Valori nutrizionali della lattuga (INRAN).

Tra i valori riportati spiccano, per quello che riguarda i sali minerali, quelli relativi al potassio ed al sodio. Tra i *phytochemicals*, invece, abbondante è la vitamina C: secondo l'INRAN, tuttavia, il suo contenuto è di circa 10 volte inferiore a quello di frutti, come ad esempio le arance, solitamente identificati come fonti principali di questo composto fitochimico. Sono misurate quantità rilevanti anche di vitamina A, per le quali valgono le medesime considerazioni fatte per la vitamina C. Un'altra vitamina presente in quantità rilevanti è il fillochinone o vitamina K1, il cui contenuto è stimato tra 100 e 200 µg/100 g: tuttavia nei cibi che ne sono estremamente ricchi, come ad esempio gli spinaci, ammonta a 300-600 µg/100 g (Bolton-Smith e altri, 2000). Nella lattuga si trovano inoltre i composti polifenolici. Anche in questo caso, come in quello della pesca, la classe preponderante è quella degli acidi cinnamici, ma sono presenti anche i flavonoidi (fig. 5.39) (Heimler e altri, 2007).

Tra gli acidi cinnamici dominano i caffeoil-derivati (Heimler e altri, 2007). Fra questi sono stati individuati: caffeoilmalato, acido clorogenico, dicaffeoilquinato e dicaffeoilmalato (il composto preponderante) (DuPont e altri, 2000).

sample	flavonoids	caffeoyl derivatives	total phenolics
1, Canasta	0.2553	1.5422	1.7975
2, Catalogna	0.1512	0.7778	0.929
3, Oak leaf	0.4457	1.9892	2.4349
4, Salad bowl	0.4114	1.4149	1.8263
5, Red salad bowl	0.3641	1.7099	2.074

Figura 5.39. Contenuto di flavonoidi e acidi cinnamici (caffeoil-derivati) (mg/kg di peso fresco) in cinque varietà di lattuga.

Per quello che riguarda i flavonoidi, invece, nelle foglie della lattuga sono stati identificati principalmente coniugati glicosidici della quercetina e della luteolina. Quelli della cianidina sono stati riscontrati esclusivamente nelle lattughe a foglia rossa (fig. 5.40) (DuPont e altri, 2000).

variety	Q-3-rut	Q-3-gal	Q-3-glu	Q-3-gluA	L-7-gluA	Q-3-gluM	Q-3-rha	g7Q-3-gluM	C-3-glu	C-3-gluM	total
iceberg	0.0	0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3 ± 0.05
green batavia	0.0	0.0	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7 ± 0.05
cos remus	1.2 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.8 ± 0.2	4.2 ± 0.2	1.3 ± 0.1	3.3 ± 0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	9.6 ± 0.9
green salad bowl	0.0	0.3 ± 0.0	1.3 ± 0.1	9.2 ± 1.0	1.3 ± 0.2	7.6 ± 0.6	0.5 ± 0.0	0.0	0.0	0.0	19.9 ± 2.0
green oak leaf	0.0	1.2 ± 0.2	2.2 ± 0.3	14.1 ± 0.9	2.5 ± 0.1	13.0 ± 0.6	1.1 ± 0.2	0.0	0.0	0.0	32.9 ± 2.3
red oak leaf	0.0	0.0	5.5 ± 0.1	8.6 ± 0.6	7.8 ± 0.5	38.5 ± 1.6	3.0 ± 0.2	0.0	2.2 ± 0.2	10.6 ± 0.1	76.2 ± 4.0
lollo biondo	0.0	1.7 ± 0.2	10.2 ± 1.1	23.4 ± 0.6	9.5 ± 0.7	47.1 ± 1.4	3.8 ± 0.1	1.6 ± 0.6	0.0	0.0	95.7 ± 4.2
lollo rosso	0.0	1.8 ± 0.1	23.1 ± 0.8	24.9 ± 0.4	23.3 ± 0.8	95.7 ± 3.1	8.5 ± 0.6	3.2 ± 0.4	5.8 ± 0.3	20.7 ± 0.5	207 ± 13.0

^a Micrograms per gram of fresh weight expressed as aglycon, three to five replicates.

Figura 5.40. Contenuto dei diversi flavonoidi in otto differenti varietà di lattuga (Q-3-rut = rutina, Q-3-gal = quercetina 3-O-galattoside, Q-3-gul = quercetina 3-O-glucoside, Q-3-gulA = quercetina 3-O-glucuronide, L-7-gulA = luteolini 3-O-glucuronide, Q-3-gluM = quercetin 3-O-(6-O-malonil)glucoside, Q-3-rha = quercetin 3-O-ramnoside, g7Q-3-gluM = quercetin 3-O-[(6-O-malonil)glucoside]7-glucoside, C-3-glu = cianidin 3-O-glucoside, C-3-gluM = cianidi 3-O-(6-O-malonil)glucoside).

In accordo con il ruolo giocato dai raggi UVB nell'accumulo dei flavonoidi nei tessuti vegetali (Lois, 1994), nella lattuga la

concentrazione maggiore di tali *phytochemicals* si riscontra nelle foglie più esterne (Crozier e altri, 1997).

5.6 Il programma alimentare *5 a day for a better health*

Il *5 a day for a better health* è un programma di educazione alimentare lanciato negli USA a partire dal 1991 con l'obiettivo di incrementare il consumo di frutta e verdura ad almeno cinque porzioni quotidiane (Reynolds, 1991; Heimendinger e Chapelsky, 1996). E' iniziato a livello locale nel 1988 in California dove, nel giro di soli tre anni, ha mostrato di aver aumentato nella popolazione il consumo di vegetali e la consapevolezza del ruolo protettivo di frutta e verdura nei confronti del cancro (Foerster e altri, 1995). Sull'onda di questo successo è poi divenuto un programma a carattere nazionale a partire dal 1991. I principali promotori del *5 a day for a better health* sono il NCI, ente deputato all'aspetto scientifico del programma e la *Produce for Better Health Foundation*, fondazione rappresentativa dell'industria della frutta e della verdura.

Le radici di tale progetto affondano nella forte correlazione inversa fra consumo di vegetali e incidenza di patologie tumorali messa in luce da alcuni studi epidemiologici condotti in quel periodo (Steinmetz e altri, 1991; Block e altri, 1992). Tale correlazione si diffondeva in una popolazione nella quale il consumo medio di vegetali ammontava a 3.4 porzioni al giorno e solo il 23% degli americani consumava il quantitativo di frutta e verdura raccomandato (Subar e altri, 1992). Unitamente a ciò, Doll e Peto (1981) avevano da poco stimato che il cancro fosse responsabile del 23% dei decessi negli Stati Uniti, il 35% o più dei quali poteva essere attribuito alla dieta insalubre diffusa fra la popolazione. Nel 1993 tali stime si traducevano in 300.000 decessi annui e 35 miliardi di dollari di spese mediche annue (intese come spese dirette e riduzione della produttività) per cause riconducibili alla dieta (*American Cancer Society* e *American Heart Association*, 1992).

Nel corso degli anni il messaggio del programma *5 a day for a better health* si è via via affinato. Mentre nel primo decennio del progetto si è promossa la conoscenza di ciò che è salubre e salutare, per i successivi dieci anni si è voluto proporre un messaggio diverso: consumare quotidianamente la più ampia varietà possibile di frutta e verdura (fino a 9 porzioni di vegetali al giorno) facendo riferimento ai cinque gruppi di colori - giallo/arancio, rosso, verde, blu/viola, bianco - in cui frutta e verdura sono solitamente suddivisi, con un conseguente cambiamento del motto del programma in *5 a day the color way* (fig. 5. 40). (www.5aday.org).



Figura 5. 40. I cinque gruppi di colori in cui i vegetali vengono suddivisi.

Nell'ottica del programma alimentare *5 a day for a better health*, mangiare cinque o più porzioni di frutta e verdura colorate al giorno garantirebbe all'organismo il *mix* vario e bilanciato di differenti antiossidanti utile a ridurre i processi di invecchiamento e ossidativi alla base delle patologie degenerative (ipotesi antiossidante) (Stanner e altri, 2004). Ogni ortaggio infatti contiene uno spettro specifico di differenti vitamine, sali minerali, fibre e composti fitochimici. Ecco perché il programma punta sul colore, un elemento semplice ma accattivante sia per adulti che bambini, come chiave per mangiare in modo sano, corretto e per usufruire appieno dei benefici dei vegetali.

Il corredo cromatico di frutta e verdura ha una precisa corrispondenza nutrizionale:

- blu/viola: uva, frutti di bosco, prugne, melanzane, radicchio, ecc..sono particolarmente ricchi di antocianine, polifenoli noti per effetti protettivi sui capillari. Sono presenti anche vitamina C, fibre e potassio;
- verde: questo gruppo comprende ortaggi come broccoli, cavoli, spinaci, lattuga, uva, kiwi che sono particolarmente ricchi di clorofille, polifenoli, isotiocianati, indoli, vitamina C e β -carotene;
- bianco: aglio, cipolla, scalogno, porri, finocchi, pere, mele, ecc...contengono in grandi quantità composti contenenti zolfo, selenio, polifenoli, iodio, vitamine, ecc...;
- giallo/arancione: ortaggi come arance, papaia, pesche, ananas, zucca, ecc..sono particolarmente ricchi di β -carotene, vitamina B, C, E e flavonoidi;
- rosso: quando si aggiungono cibi di questo colore alla dieta come pomodori, peperoni, ciliegie, fragole, ecc... si stanno assumendo importanti antiossidanti come licopene, antocianine, vitamina A, ecc...

Il programma alimentare sponsorizzato dal NCI ha determinato negli USA un incremento del consumo medio di frutta e verdura da poco più di 3 porzioni nel 1991 a più di 5 negli anni successivi al lancio del programma (fig. 5. 41) (Johnston e altri, 2000).

Survey	Fruit and vegetable consumption	Portion of population consuming ≥ 5 servings/d
	<i>servings/d</i>	%
NHANES I (1971-1974)	ND ²	43
NHANES II (1976-1980)	2.9	14
CSFII (1985)	2.9	ND
CSFII (1989-1991)	4.3	32
5-A-Day Baseline Survey (1991)	3.4	23
Telephone survey, CDC (1990)	3.8	20
Telephone survey, CIS (1993)	3.8	30
CSFII (1994-1996)	5.2	45

Figura 5. 41. Andamento del consumo di frutta e verdura nella popolazione americana.

Sulla scia di questi risultati incoraggianti, sulla falsariga dell'americano *5 a day*, si sono successivamente sviluppati in Europa simili programmi di educazione alimentare: *5 am tag* in Germania, *10 par jour* in Francia, *Go 5 a day* in Inghilterra, *5 al dia* in Spagna, *6 om dagen* in Danimarca, *Every day 2+2* in Olanda, *3 a day* in Ungheria, *Obst mal 5* in Austria, *5 om dan* in Svezia, ecc...

Tuttavia, nonostante l'ampia diffusione del messaggio *5 a day* in Europa e negli USA, gli unici lavori presenti in letteratura sono stati condotti con lo scopo di studiare l'efficacia del programma *5 a day* nell'incrementare il consumo medio di frutta e verdura in specifiche popolazioni *target* (Havas e altri, 1995). Attualmente non è stato realizzato alcuno studio sperimentale o clinico volto ad attestare l'efficacia chemiopreventiva della dieta basata sull'assunzione giornaliera di almeno una porzione di frutta o verdura per ognuno dei cinque gruppi di colore in cui i vegetali vengono suddivisi. Tuttavia, sono presenti in letteratura numerosi studi epidemiologici che metterebbero in correlazione il consumo di frutta e verdura ad diminuito rischio di certi tumori (Zhang e altri, 2009; van Duijnhoven e altri, 2009; Kurahashi e altri, 2009; Benetou e altri, 2008; Freedman e altri, 2008).

CAPITOLO 6

MATERIALI E METODI

6.1 Trattamento e sacrificio degli animali

Gli esperimenti sono stati condotti su ratti maschi del ceppo *Sprague Dawley* del peso di 200 ± 10 g; gli animali sono stati pre-stabulati per una settimana prima del trattamento, alimentati con pellet-dieta standard per roditori (ditta Nossan) e acqua *ad libitum*, sottoponendoli a cicli circadiani (Tab. 6.1).

Condizioni ambientali	Dati
Ore di luce	12
Ore di buio	12
Temperatura	$22 \pm 1^\circ \text{C}$
Umidità	$60 \pm 1\%$

Tabella 6.1. Parametri ambientali ai quali sono stati mantenuti gli animali.

I ratti sono stati trattati *per os* mediante sonda intragastrica per 10 giorni consecutivi con liofilizzato di frutta o verdura convenzionale *in toto*. Le dosi somministrate sono state calcolate, in relazione all'uomo, in porzioni, che rappresentano le quantità *standard* di alimento (espressa in grammi) assunte come unità di misura da utilizzare per un'alimentazione equilibrata. Secondo la Società Italiana della Nutrizione Umana (SINU) una porzione di frutta, ortaggi e verdura a foglia corrisponde rispettivamente a 150, 250 e 50 grammi in un uomo del peso medio di 70 kg. Con le dovute proporzioni, gli animali hanno ricevuto quotidianamente sotto forma di liofilizzato, l'equivalente di:

- una porzione di pesca, cipolla, uva nera, pomodoro o lattuga per le mono-diete del colore giallo, bianco, viola, rosso e verde, rispettivamente;

- cinque porzioni di pesca, cipolla, uva nera, pomodoro o lattuga per le mono-diete del colore giallo, bianco, viola, rosso e verde, rispettivamente (fig. 5.1 A);
- cinque porzioni di frutta o verdura costituite da una porzione di pesca, cipolla, uva nera, pomodoro e lattuga (dieta *5 a day*) (fig. 6.1 B).

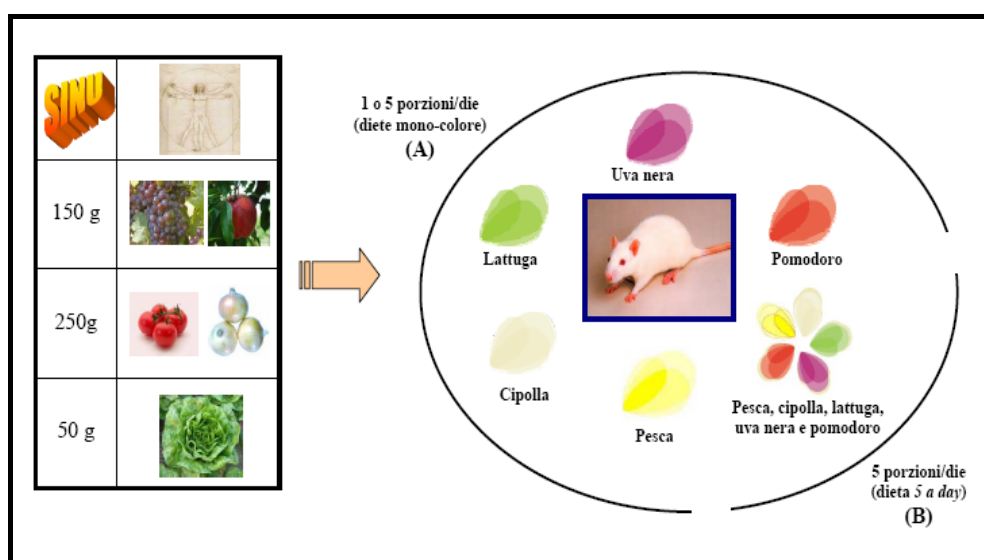


Figura 6.1. Schema del trattamento animale.

Al momento del trattamento, i liofilizzati sono stati risospesi in un volume di acqua tale da non somministrare a ciascun animale più di 1ml per ogni 100 g di peso. Sono stati utilizzati sei animali per gruppo sperimentale. I ratti del gruppo di controllo sono stati trattati con il solo veicolo e mantenuti nelle stesse condizioni ambientali.

Gli animali sono stati messi a digiuno la notte precedente il sacrificio, avvenuto il giorno dopo la fine del trattamento mediante decapitazione con ghigliottina previo stordimento per roteazione, in accordo con le procedure Ministeriali in vigore.

A ciascun animale è stato prelevato per intero il fegato, che è stato posto immediatamente in azoto liquido (-196°C) e conservato in freezer a -80°C fino al momento della preparazione della frazione

microsomiale e citosolica. Inoltre, immediatamente prima del sacrificio, da ogni animale è stato prelevato un campione di sangue dalla vena caudale.

6.2 Studio delle attività enzimatiche

6.2.1 Determinazione dell'attività degli enzimi del drug-metabolism

6.2.1.1 Preparazione della frazione microsomiale e citosolica

Come illustrato nel capitolo 2, la maggior parte degli enzimi del *drug-metabolism* è situata nelle membrane lipofile del REL del fegato e di altri tessuti. Quando queste membrane lamellari sono isolate mediante omogeneizzazione dei tessuti e successivo frazionamento dei costituenti cellulari, esse tendono ad assumere la forma di vescicole dette microsomi. Questi ultimi conservano le caratteristiche morfologiche e funzionali delle membrane intatte, compreso il profilo enzimatico.

Il fegato è stato lavato accuratamente in tampone di omogeneizzazione Tris-Acetato 0.1 M (pH 7.4) con KCl 1.15% ed EDTA 1 mM allo scopo di rimuovere i residui di emoglobina che interferirebbero nella determinazione delle attività enzimatiche in studio. L'organo viene successivamente pesato e omogenato con 4 ml dello stesso tampone per ogni grammo di peso dell'organo utilizzando un omogeneizzatore potter (con pestello in teflon) immerso in ghiaccio. L'omogenato è centrifugato a 9.000 x g alla temperatura di 2-3°C per 20 minuti in una centrifuga preparativa refrigerata (Sorwall RC5C). Il sovrinatante post-mitocondriale S9 così ottenuto viene prelevato e centrifugato a 105.000 x g per 65 minuti ad una temperatura compresa tra 0 e 4°C in ultracentrifuga (Sorwall ODT Combi 80.000). Il sovrinatante (citosol) viene recuperato e stoccato a -80°C, mentre il precipitato viene risospeso in un volume di tampone

di lavaggio $K_2P_2O_7$ 0.1 M (pH 7.4) con EDTA 1 mM pari a quello del citosol eliminato, utilizzando un potter a mano immerso in ghiaccio per 5 minuti. Tale omogenato viene centrifugato nuovamente a $105.000 \times g$ per 65 minuti ad una temperatura compresa tra 0 e $4^\circ C$ in ultracentrifuga (Sorwall ODT Combi 80.000). Il precipitato viene risospeso in un volume di tampone finale Tris-Acetato 10 mM (pH 7.4) con EDTA 1 mM e glicerolo 20% pari a quello del sovrantante eliminato utilizzando un potter a mano immerso in ghiaccio per almeno 7 minuti. I microsomi così ottenuti vengono congelati in azoto liquido e conservarli in freezer a $-80^\circ C$ fino al momento del loro utilizzo. La preparazione della frazione microsomiale secondo questa procedura previene lo sviluppo della perossidazione lipidica o l'azione di proteasi, notoriamente attive anche a temperature inferiore a $-60^\circ C$ (Paolini e altri, 1983).

6.2.1.2 Concentrazione delle proteine (metodo di Lowry)

La stima quantitativa del contenuto proteico dei microsomi e del citosol è richiesta in quanto le attività delle diverse isoforme sono espresse per unità di proteina.

Il metodo è basato sulla formazione di complessi tra lo ione Cu^{2+} e quattro atomi di azoto peptidici delle proteine. In condizioni alcaline il Cu^{2+} è ridotto a Cu^{1+} . Quest'ultimo, attraverso i residui di tirosina e triptofano, catalizza a sua volta la riduzione dei sali di fosfotungstato e fosfomolibdato del reattivo di Folin. Così ridotti, tali sali generano un colore blu che può essere misurato a 700-750 nm.

Vista la sensibilità del metodo, per ottenere una concentrazione proteica tale da rientrare nell'intervallo esplorato con gli standards (da 0 a 100 mg/ml), al cui interno la curva di taratura risulta lineare, si diluisce il campione 200 volte (microsomi) o 500 volte (citosol) con acqua bidistillata. La risposta viene riferita a quella ottenuta attraverso una curva standard di albumina sierica bovina di 100 mg/ml in acqua,

concentrazione che risulta nella parte superiore dell'intervallo di linearità.

Si preparano una serie di provette che verranno suddivise in standard (S), bianche (B) e prove (P) in cui verranno posti rispettivamente 1 ml di albumina standard, 1 ml di acqua bidistillata e 1 ml di campione microsomiale o citosolico diluito.

A tempo in ogni provetta si aggiungono vortexando:

- 2 ml di reagente rameico in soluzione alcalina vortexando (tenere conto del rapporto 0.5 ml di soluzione di CuSO_4 0.5% (p/v) in sodio citrato 1% + 25 ml di soluzione di Na_2CO_3 in NaOH 0.1 N).
- 0.2 ml di reattivo di Folin-Ciocalteu opportunamente diluito (tenere conto del rapporto 2 ml di reagente di Folin-Ciocalteu concentrato + 3 ml di acqua bidistillata);

Il contenuto proteico di ogni provetta viene determinato in termini di assorbenza mediante lettura allo spettrofotometro a 750 nm contro l'acqua (Lowry e altri, 1951).

6.2.1.3 Citocromo P450

Il citocromo P450 viene determinato osservando la differenza di assorbimento fra 450 e 490 nm dello spettro differenziale ottenuto fra citocromo P450 ridotto e legato a CO rispetto alla forma ridotta ($\epsilon = 91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Infatti, in seguito alla riduzione del ferro del gruppo eme a ione ferroso (Fe^{2+}), i CYP acquisiscono la capacità di legare il monossido di carbonio (CO) al sesto sito di coordinazione. Il complesso CO- Fe^{2+} -S-cys, rispetto alla forma ridotta libera, conferisce ai CYP un caratteristico picco di assorbimento tra 447 e 452 nm (fig.6.2) (Omura e Sato, 1964).

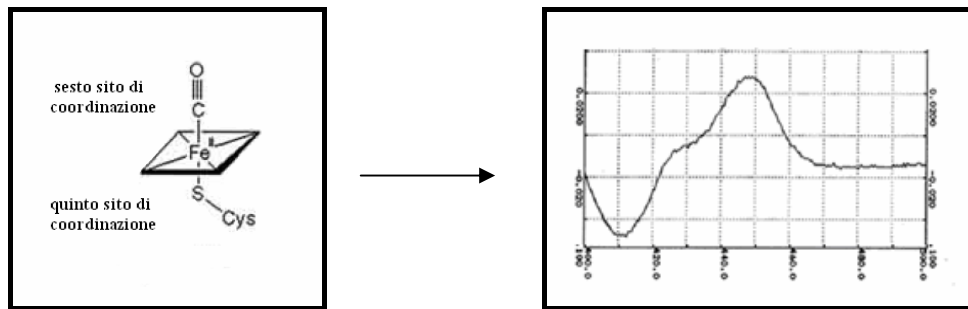


Figura 6.2. Spettro differenziale e caratteristico picco di assorbimento a 450 nm del core eminico del citocromo P450 nm complessato a CO.

6.2.1.4 NADPH-citocromo (P450)-c-reduttasi

Questa attività è basata sulla capacità della NADPH citocromo (P450) c reduttasi di ridurre il gruppo eme del citocromo c impiegando gli elettroni forniti dal NADPH. Il prodotto di reazione (citocromo c - Fe²⁺) può essere monitorato spettrofotometricamente per via della sua assorbanza specifica a 550 nm (fig. 6.3).

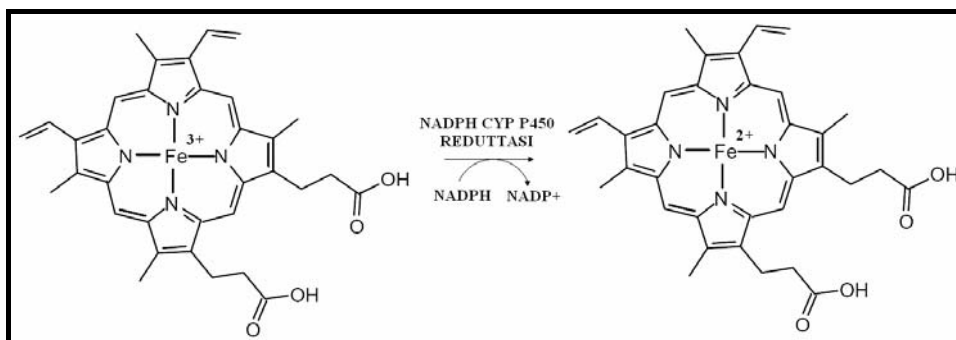


Figura 6.3. Riduzione dell'eme del citocromo c ad opera della NADPH citocromo (P450) c reduttasi.

L'attività specifica utilizzando il coefficiente di estinzione molare $\epsilon = 19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Bruce, 1967).

6.2.1.5 Amminopirina N-demetilasi (APND)

Questa determinazione è basata sulla capacità dell'isoforma CYP3A1/2 di demetilare in modo specifico l'amminopirina e generare un composto dealchilato e formaldeide come prodotti di reazione (fig. 6.4).

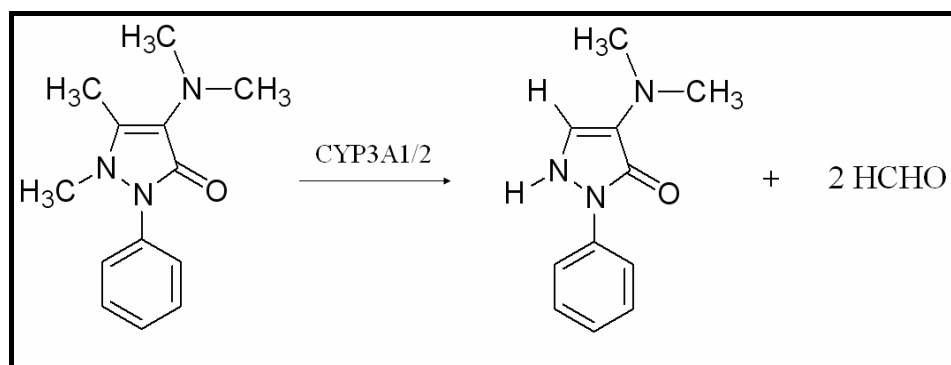


Figura 6.4. Metabolismo dell'amminopirina da parte dell'isoforma CYP3A1/2.

La formaldeide, in presenza di acetilacetone e sali di ammonio (reagente di Nash), reagisce formando la 3,5-diacetil-1,4-diidrolutidina (DDL), un composto di colore giallo la cui formazione può essere monitorata spettrofotometricamente per via della sua assorbanza specifica a 412 nm. L'attività specifica si calcola utilizzando il coefficiente di estinzione molare $\epsilon = 8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Nash, 1953).

6.2.1.6 p-Nitrofenolo idrossilasi (pNFI)

Questa attività è basata sul fatto che il p-nitrofenolo è metabolizzato dall'isoforma CYP2E1 a 4-nitrocatecolo (fig. 6.5) che, in ambiente alcalino, assorbe a 546 nm.

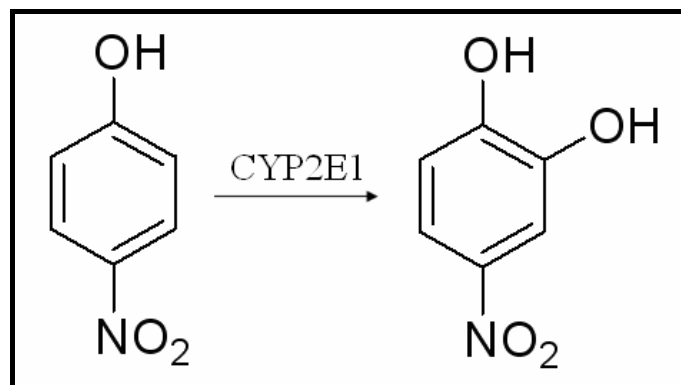


Figura 6.5. Formazione del 4-nitrocatecolo ad opera dell'isoforma CYP2E1.

L'attività specifica si calcola utilizzando il coefficiente di estinzione molare $\epsilon = 10.28 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Reinke e altri, 1985).

6.2.1.7 Pentossiresorufina *O*-dealchilasi (PROD), metossiresorufina *O*-demetilasi (MROD), etossiresorufina *O*-deetilasi (EROD)

1) La pentossiresorufina viene utilizzata come *probe* specifico per la determinazione dell'attività dell'isoforma CYP2B1/2. Il prodotto di reazione è la resorufina (fig. 6.6) la cui formazione viene monitorata spettrofluorimetricamente seguendo un aumento del suo segnale di (emissione di) fluorescenza a 588 nm.

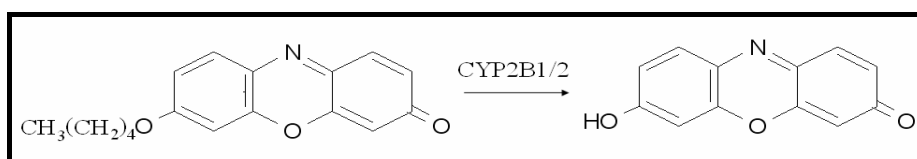


Figura 6.6. Metabolismo della pentossiresorufina a resorufina ad opera dell'isoforma CYP2B1/2.

Si registra la cinetica temporale della reazione e si determina l'attività specifica confrontando i valori ottenuti con quelli relativi ad aggiunte *standard* di resorufina alla miscela di incubazione al *plateau* della cinetica temporale registrata (Lubet e altri, 1985).

2) La metossiresorufina viene invece utilizzata come *probe* specifico per la determinazione dell'attività dell'isoforma CYP1A2. Il prodotto di reazione è sempre la resorufina (fig. 6.7).

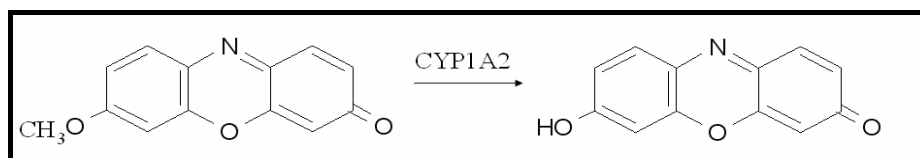


Figura 6.7. Metabolismo della metossiresorufina a resorufina ad opera dell'isoforma CYP1A2.

Questa attività viene determinata in modo del tutto analogo alla precedente (Burke e altri, 1985).

3) L'etossiresorufina è impiegata come *probe* specifico per l'isoforma CYP1A1 che genera come prodotto di reazione la resorufina (fig. 6.8).

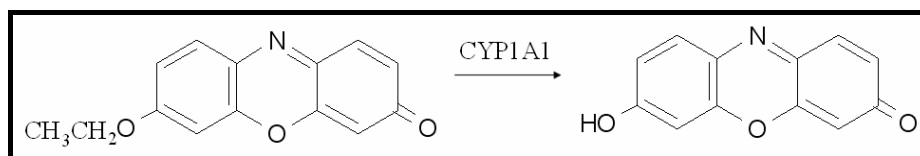


Figura 6.8. Metabolismo dell'etossiresorufina a resorufina ad opera dell'isoforma CYP1A1.

Anche questa attività viene determinata in modo del tutto analogo a quelle sopra descritte (Lubet e altri, 1985).

6.2.1.8 7-Etossicumarina O-deetilasi (ECOD)

Questa determinazione è basata sulla capacità di diverse isoforme di citocromo P450 (CYP1A1/2, CYP2A, CYP2B e CYP2E1) di dealchilare la 7-etossicumarina generando come prodotto di reazione

l'umbelliferone (fig. 6.9). Quest'ultimo, eccitato a 390 nm, emette fluorescenza a 440 nm in ambiente alcalino

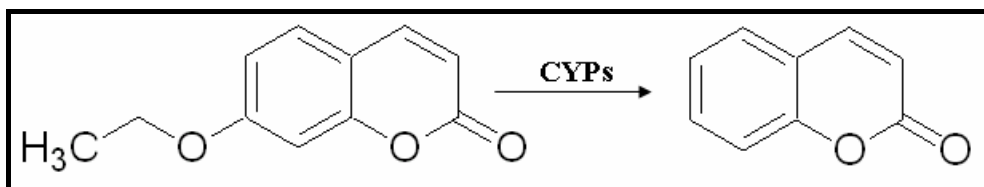


Figura 6.9. Metabolismo della 7-etossicumarina da parte di diverse isoforme CYPs.

L'attività specifica viene determinata utilizzando una curva di taratura ottenuta impiegando quantità note di prodotto di reazione (umbelliferone) (Aitio, 1978).

6.2.1.9 Testosterone idrossilasi (TOH)

Questa attività è basata sul fatto che il testosterone rappresenta un multiprobe che viene idrossilato in maniera regio- e stereoselettiva dalle diverse isoforme di CYP (fig. 6.10) e permette quindi di valutare contemporaneamente la modulazione dei diversi isoenzimi P450.

I metaboliti generati sono stati separati e identificati mediante HPLC (con detector UV a lunghezza d'onda fissa di 254 nm) utilizzando una colonna analitica in acciaio inossidabile in fase inversa Nova-Pak®C18 (60A°, 4 µm, 3.9 x 150 mm, Waters). L'identificazione e la misurazione del quantitativo di ciascun metabolita nel campione sono state possibili grazie all'ausilio di curve di calibrazione dei metaboliti standard 6α-, 7α-, 6β, 16α-, 16β-, 2α- e 2β-idrossitestosterone, 4-androsten-3,17-dione e di corticosterone, utilizzato come standard interno per valutare l'efficienza di estrazione di ogni campione. La sensibilità del saggio permette di calcolare attività catalitiche non inferiori a 20 pmol/mg prot/min (Platt e altri, 1989).

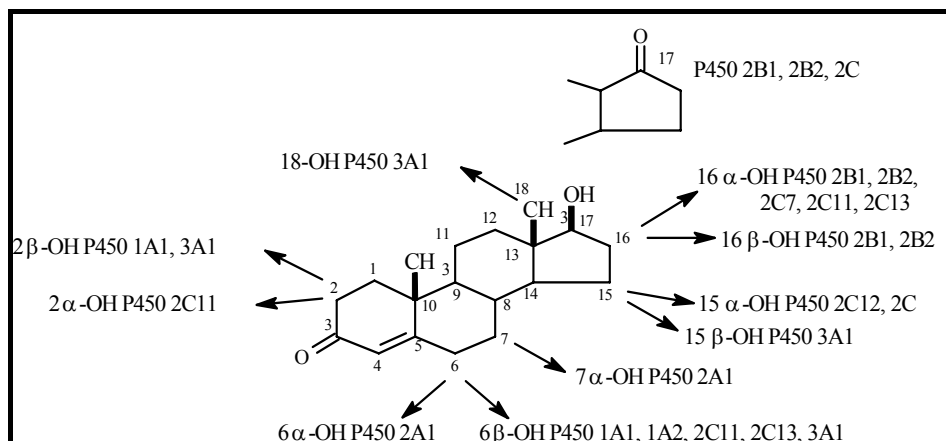


Figura 6.10. Idrossilazione regio- e stereo-selettiva del testosterone da parte delle diverse isoforme CYP di ratto.

6.2.1.10 Glutathione *S*-transferasi (GST)

L'attività della GST viene determinata sulla base della capacità di questo enzima di coniugare il substrato 1-Cl-2,4-dinitrobenzene (CDNB) con il glutathione ridotto (GSH) per dare il prodotto 1-(*S*-glutathionoil)-2,4-dinitrobenzene (fig. 6.11). Quest'ultimo assorbe in modo specifico a 340 nm e può quindi essere rilevato spettrofotometricamente.

L'attività specifica viene calcolata utilizzando il coefficiente di estinzione molare $\epsilon = 9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Habig e altri, 1974).

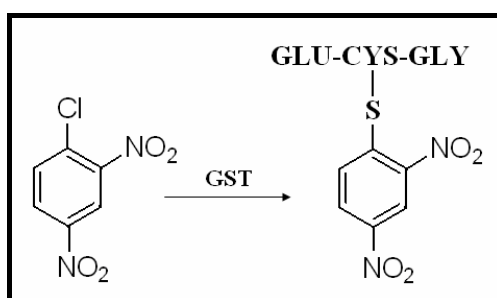


Figura 6.11. Coniugazione del CDNB con glutathione.

6.2.1.11 UDP-glucuroniltransferasi (UDPGT)

La determinazione di questa attività viene eseguita sfruttando la capacità delle UDPGT di catalizzare la formazione di un legame glicosidico fra il substrato 1-naftolo e l'acido glucuronico (fig. 6.12). Il prodotto di reazione, l'1-naftolo-glucuronide, può essere monitorato spettrofluorimetricamente in quanto emette fluorescenza a 335 nm.

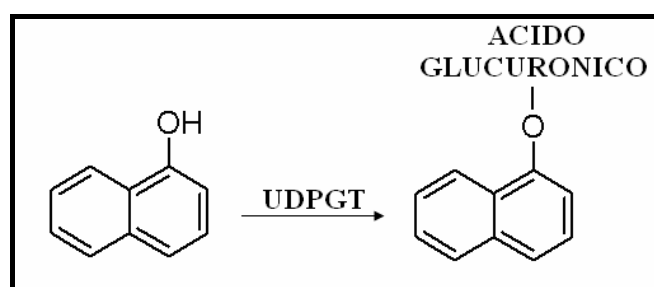


Figura 6.12. Glucuronoconiugazione dell'1-naftolo.

L'attività specifica viene calcolata confrontando i valori ottenuti con quelli relativi ad aggiunte *standard* di 1-naftolo-glucuronide alla miscela di incubazione al *plateau* della cinetica temporale registrata (Mackenzie e altri, 1980).

6.2.2 Determinazione dell'attività degli enzimi antiossidanti

6.2.2.1 Catalasi (CAT)

Il metodo di Aebi (1984) è stato usato per misurare l'attività della catalasi, seguendo spettrofotometricamente a 240 nm la decomposizione di H_2O_2 ad opera dell'enzima. L'attività è stata calcolata considerando il coefficiente di estinzione molare di $43,6 M^{-1} cm^{-1}$ ed è espressa come μ mol di H_2O_2 consumate per minuto per milligrammo di proteine cellulari.

6.2.2.2 Superossido dismutasi (SOD)

Questo saggio enzimatico è stato determinato con il metodo di Marklund e Marklund (1974), misurando a 420 nm l'inibizione da parte della superossido dismutasi dell'autoossidazione del pirogallolo. Per il calcolo dell'attività totale della SOD, espressa in nmoli di prodotto generato al minuto per milligrammo di proteine cellulari, è necessario riferirsi ad una curva standard costruita mediante l'utilizzo di SOD commerciale a varie concentrazioni.

6.2.2.3 Glutazione reduttasi (GSSG-Red)

L'attività della glutazione reduttasi è stata misurata a 37°C seguendo a 340 nm il consumo di NADPH, considerando che il NADPH agisce come donatore di equivalenti riducenti in rapporto 1:1 con il glutazione che viene ridotto. Il calcolo dell'attività è stato eseguito considerando il coefficiente di estinzione molare $6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ed è espressa come nmoli di NADPH consumate per minuto per milligrammo di proteine cellulari (Wheeler e altri, 1990).

6.2.2.4 Glutazione perossidasi (GSH-Px)

Questa attività è stata dosata a 37°C seguendo il metodo di Flohé L, Günzler (1984) che prevede il monitoraggio a 340 nm del consumo di NADPH in una miscela di reazione contenente, oltre al citosol e al NADPH, il glutazione ridotto, il t-butilidroperossido e l'enzima GSSG-reduttasi. L'attività della GSH-Px si calcola usando il coefficiente d'estinzione molare $\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, ed è espressa come nmoli di NADPH consumate per minuto per milligrammo di proteine cellulari.

6.2.2.5 DT-diaforasi

La determinazione dell'attività della DT-diaforasi (o NADPH chinone-ossidoreduttasi 1) si basa sulla capacità di questo enzima di

catalizzare la formazione di idrochinoni a partire da molecole chinoniche. Si segue spettrofotometricamente a 600 nm la riduzione del diclorofenolo-indofenolo (DCPIP, un accettore di elettroni) a metabolita incolore. L'attività è stata calcolata considerando il coefficiente di estinzione molare del DCPIP $\epsilon = 22.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ed è espressa come nmoli di DCPIP ridotto per minuto per milligrammo di proteine cellulari (Ernster, 1967).

6.3 Studio dell'espressione genica

6.3.1 Elettroforesi su gel di poliacrilammide e Western blotting

L'elettroforesi è una tecnica che permette di separare le proteine in base al peso molecolare attraverso una corsa elettroforetica in gel di poliacrilammide.

La corsa è stata realizzata tramite un gel di poliacrilammide al 10% contenente sodio dodecilsolfato utilizzando l'apparato "Mini Protean II" (Bio-Rad). Sul gel sono stati caricati 5 μg (CYP1A1/2, CYP2B1/2, CYP3A1/2) oppure 1 μg (CYP2E1) di proteine microsomiali epatiche. La corsa elettroforetica è stata eseguita ad un voltaggio costante di 250 V per circa 45 minuti. Le proteine, separate in base al loro peso molecolare, sono state trasferite dal gel alla membrana di nitrocellulosa tramite *elettroblotting* utilizzando una corrente costante di 200 mA per 90 minuti. La nitrocellulosa è stata successivamente trattata con tampone TBS allo 0,2% di Tween₂₀ contenente albumina sierica al 5% per circa 4 ore per bloccare i siti aspecifici. Sono stati aggiunti quindi gli anticorpi primari policlonali opportunamente diluiti in tampone TBS allo 0,2 % di Tween₂₀ contenente albumina bovina sierica al 1% e incubati *overnight* a 4°C (Tab. 6.2).

Isoforma CYP	Anticorpo primario	Diluizione
CYP1A1/2	IgG anti-1A1 di ratto sviluppato in coniglio	1:100
CYP2B1/2	IgG anti-2B1 di ratto sviluppato in coniglio	1:1000

CYP2E1	IgG anti-2E1 di ratto sviluppato in coniglio	1:100
CYP3A1/2	IgG anti-3A2 di ratto sviluppato in capra	1:500

Tabella 6.2. Diluizione degli anticorpi primari impiegati per il Western Blotting.

Gli anticorpi secondari, che si sono legati al complesso antigene-anticorpo, sono stati opportunamente diluiti in tampone TBS allo 0,2% di Tween₂₀ contenente albumina bovina sierica al 1% e incubati per circa 1 ora a temperatura ambiente (Tab. 6.3).

Isoforma CYP	Anticorpo secondario	Diluizione
CYP1A1/2	IgG anti-IgG di coniglio	1:3000
CYP2B1/2	IgG anti-IgG di coniglio	1:5000
CYP2E1	IgG anti-IgG di coniglio	1:3000
CYP3A1/2	IgG anti-IgG di capra	1:3000

Tabella 6.3. Diluizione degli anticorpi secondari impiegati per il Western Blotting.

L'anticorpo secondario, coniugato alla perossidasi di rafano, in presenza di opportuni substrati ha permesso di rilevare il segnale di presenza delle proteine. Queste ultime sono state visualizzate tramite impressione su lastra fotografica utilizzando il kit *SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate* (Pierce). Le bande sulla lastra fotografica sono state infine analizzate tramite il software SCION IMAGE per una comparazione relativa fra gli animali di controllo e i trattati (Towbin e altri, 1979; Laemmli, 1970).

6.3.2 Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

6.3.2.1 Estrazione dell'RNA totale

50-100 mg di tessuto ancora congelato viene omogeneizzato in un potter con 1 ml di soluzione denaturante *TriPure Isolation* (Roche) e

trasferito in una eppendorf. L'omogenato viene centrifugato a 12.000 rpm per 10 minuti a 4°C. Si trasferisce in una nuova eppendorf il sovrantante contenente RNA, DNA e proteine. Al sovrantante si aggiunge 200 µl di cloroformio puro freddo per ogni ml di soluzione *TriPure* usata inizialmente, si agita con il vortex per 15 secondi e si lascia a temperatura ambiente per 15 minuti. Le tre fasi (proteine, DNA ed RNA) vengono poi separate mediante centrifugazione a 12.000 rpm per 15 minuti a 4°C. La fase acquosa incolore sovrastante, contenente l'RNA viene trasferita in una nuova eppendorf e vi si aggiunge 500 µl di isopropanolo puro freddo (per ogni ml di soluzione *TriPure*). Dopo aver agitato manualmente si lascia il campione a temperatura ambiente per 10 minuti, successivamente si centrifuga a 12.000 rpm per 10 minuti. Il pellet ottenuto, contenente l'RNA, viene risospeso con 1 ml di etanolo al 75% freddo e successivamente centrifugato a 10.000 rpm per 5 minuti a 4°C. Infine, il pellet viene completamente essiccato e risospeso in 50-60 µl di acqua *RNasi-free*. Per solubilizzare completamente il pellet di RNA si incuba il campione per 10-15 minuti a 55-60°C.

I campioni di RNA ottenuti sono stati esaminati al *Nano-drop* o allo spettrofotometro al fine di:

- ricavare la concentrazione in µg/ml di RNA estratto: a 260 nm la densità ottica (O.D.) pari a 1 corrisponde a una concentrazione di 40 µg/ml per l'RNA;
- valutare indicativamente il grado di purezza della preparazione: un rapporto di assorbimento a 260/280 nm > 1.7 indica un buon contenuto di acidi nucleici (principalmente RNA) rispetto al contenuto di proteine.

Infine, l'integrità della macromolecola estratta è stata valutata correndo almeno 0.5 µg di RNA su gel denaturante (formaldeide al 16%) di agarosio all'1% per 15 minuti in apparati orizzontali ad un voltaggio costante di 80-100 V.

6.3.2.2 Retrotrascrizione dell'RNA totale

La retrotrascrizione dell'RNA totale in cDNA è stata eseguita mediante l'impiego del kit *QuantiTect[®] Reverse Transcription* (Quiagen). Quest'ultimo prevede due *steps* successivi: il primo rimuove la contaminazione da DNA genomico mediante trattamento con DNasi, il secondo prevede la retrotrascrizione dell'RNA totale in cDNA utilizzando una *mix* di oligo-dT ed esameri *random* come *primers*.

Brevemente, per ogni campione sono state allestite almeno due delle seguenti miscele di retrotrascrizione:

1° *step* (volume finale di 14 µl):

- 2 µl di gDNA *Wipeout buffer*, 7X (contenente DNasi);
- un volume di RNA corrispondente ad 1.1 µg;
- acqua sterile fino ad un volume di 14 µl.

Tale mix viene riposto nel termociclatore per PCR a 42°C per 2 minuti.

2° *step* (volume finale di 20 µl):

Aggiungere al volume di 14 µl del 1°step:

- 1 µl di reagente *Quantiscript[®] Reverse Transcriptase* (contenente trascrittasi inversa ed inibitori delle RNasi);
- 4 µl di *Quantiscript RT buffer*, 5X (contenente Mg²⁺ e dNTPs);
- 1 µl di *RT primer mix*.

La miscela è riposta nel termociclatore per PCR a 42°C per 30 minuti e successivamente a 95°C per 3 minuti per inattivare la trascrittasi inversa. Il cDNA così ottenuto viene conservato a -20°C.

6.3.2.3 Amplificazione genica mediante PCR

Per ciascuno dei geni amplificati sono stati allestiti 25 µl della seguente miscela di reazione:

- 12.5 µl di *GoTaq GREEN MASTER MIX* (Promega);
- 1 µl di una soluzione di *primer* senso (ps) 10 µM;
- 1 µl di una soluzione di *primer* antisenso (pas) 10 µM;

- 9.5 µl di H₂O nucleasi-free;
- 1 µl di cDNA.

Per ciascun gene sono stati utilizzati i *primers* e i programmi di amplificazione mostrati in tabella 5.4 (Tab 6.4).

Gene	Amplificato (pb)	Sequenza dei <i>primers</i> (5' - - 3')	Programma e numero di cicli
β-actina	150	Ps: CCCCATTTGAACACGGCATT Pas: CATCTTTTCACGGTTGGCCTTA	95°C per 5' 95°C per 30'' } 56°C per 30'' } 22 72°C per 30'' } 72°C per 10'
CYP1A1	844	Ps: GCCNGACCTCTACAGCTT Pas: TGGGATGGTGAAGGGGA	94°C per 5' 94°C per 30'' } 47°C per 35'' } 20 72°C per 1' } 72°C per 10'
CYP1A2	625	Ps: GACATCACAGCGCCCTATT Pas: TGCTTCATGGTCAGCCGT	94°C per 5' 94°C per 30'' } 55°C per 35'' } 30 72°C per 1' } 72°C per 10'
CYP2B1	839	Ps: CATCATCTGCTCCATTGT Pas: AGGATGGTGGTGAAGAA	94°C per 5' 94°C per 30'' } 47°C per 35'' } 25 72°C per 1' } 72°C per 10'
CYP2B2	887	Ps: TGGTGGAGGARCTGCGGAAATCC Pas: TGCCTTCGCCAAGACAAAYGCG	94°C per 5' 94°C per 30'' } 60°C per 35'' } 30 72°C per 1' } 72°C per 10'

CYP2C11	248	Ps: CTGCTGCTGCTGAAACACGTG Pas: GGATGACAGCGATACTATCAC	95°C per 3' 95°C per 30'' } 55°C per 30'' } 22 72°C per 30'' } 72°C per 10'
CYP2E1	700	Ps: CGGTCGCCCTGCTGGTG Pas: CTATGGCTTCCAGGCAGGT	94°C per 5' 94°C per 30'' } 55°C per 35'' } 30 72°C per 1' } 72°C per 10'
CYP3A2	349	Ps: TACTACAAGGGCTTAGGGAG Pas: CTTGCCTGTCTCCGCCTCTT	94°C per 5' 94°C per 30'' } 60°C per 35'' } 18 72°C per 1' } 72°C per 10'
Eme- ossigenasi	229	Ps: CAGGGTGACAGAAGAGGCTAAGAC Pas: TGAGGACCCATCGCAGGAG	95°C per 3' 95°C per 30'' } 58°C per 30'' } 26 72°C per 30'' } 72°C per 10'
DT- diaforasi	492	Ps: ACTCGGAGAACTTTCAGTACC Pas: TTGGAGCAAAGTAGAGTGGT	95°C per 3' 95°C per 30'' } 53°C per 30'' } 30 72°C per 50'' } 72°C per 10'

Tabella 6.4. Sequenza dei *primers* e programmi di PCR impiegati per l'amplificazione dei CYPs.

6.4 Determinazione plasmatica della presenza di ROS mediante il test dROMs

Il d-ROMs test è un saggio spettrofotometrico che consente di determinare in un campione biologico la concentrazione degli idroperossidi (ROOH), *marker* di danno tissutale generato dall'attacco ossidativo dei ROS su svariati substrati biologici (glucidi, lipidi, aminoacidi, proteine, nucleotidi, ecc...). La comparsa della

colorazione rossa che si sviluppa durante il saggio è attribuita alla formazione, per ossidazione, del radicale cationico della N, N-dietil-para-fenilendiammina. Quest'ultimo verrebbe generato dalla concomitante riduzione dei radicali alcossilici e perossilici derivanti dalla scissione degli idroperossidi presenti nel campione per azione degli ioni Fe^{2+} e Fe^{3+} rilasciati dalle sieroproteine nell'ambiente acido creato *in vitro* (fig. 6.12).

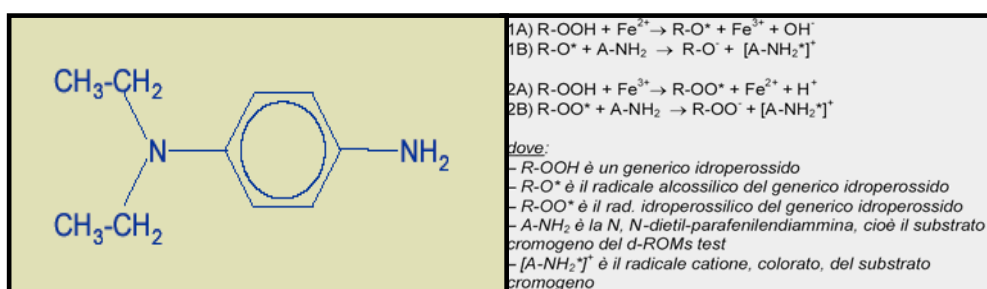


Figura 6.13. Substrato cromogeno (N, N-dietil-para-fenilendiammina) utilizzato per il d-ROMs test (sinistra), schema delle reazioni che caratterizzano il saggio (destra).

La determinazione dello stress ossidativo è stata effettuata mediante il kit d-ROMs test (*Diacron s.r.l.*, Grosseto, Italia).

Brevemente, si allestisce un bianco, uno *standard* (plasma *standard*) e 3 prove per ciascun campione (plasma eparinato) seguendo le istruzioni e utilizzando i reagenti forniti del kit. Le miscele si lasciano in incubazione a 37°C per 75 minuti. Successivamente si legge a 505 nm l'assorbanza dello *standard* e dei campioni (azzerando contro il bianco) e si calcola il livello di stress ossidativo dei campioni facendo riferimento al plasma *standard* con titolo noto di unità Caratelli (U CARR) considerando che 1 U CARR = 0.08 mg di H₂O₂/dl.

6.5 Analisi ematochimiche

Il plasma ricavato da campioni di sangue prelevati dalla vena caudale dei ratti prima del sacrificio è stato anche utilizzato per la determinazione dei più importanti parametri ematochimici presso il

Dipartimento Clinico Veterinario, Facoltà di Veterinaria, *Alma Mater Studiorum*-Università di Bologna.

6.6 Espressione dei risultati ed analisi statistica

I valori riportati sono stati ottenuti da sei differenti animali e sono espressi come la media di sette sei esperimenti \pm deviazione *standard*. Per una valutazione statistica rigorosa si è determinato, dove necessario, la probabilità di evenienza casuale P, ponendo come limiti di significatività $P = 0.05$ cioè 5% e $P = 0.01$ cioè 1%.

Risultano significative le differenze per cui $P < 5\%$ o $< 1\%$ cioè la probabilità di evenienza casuale è opportunamente bassa, minore del 5% o 1%. La probabilità di evenienza casuale è stata determinata attraverso il metodo statistico *Wilcoxon* (Box e Hunter, 1978).

CAPITOLO 7

RISULTATI

7.1 Introduzione

Al fine di stimare la possibile attività chemiopreventiva di una supplementazione secondo il programma alimentare *5 a day for a better health* e di quelle mono-colore a base di singole varietà di frutti o verdure, è stata studiata la capacità di tali supplementazioni di modulare il metabolismo epatico degli xenobiotici, le principali difese antiossidanti ed il livello sistemico di ROS *in vivo*.

A tale scopo, ratti maschi del ceppo *Sprague Dawley* sono stati trattati giornalmente con dosi di liofilizzato di frutta o verdura convenzionali *in toto* corrispondenti a una o cinque porzioni di vegetali per dieci giorni consecutivi. Gli animali non hanno manifestato nessun decremento nel peso o altri segni di sofferenza in seguito al trattamento. I ratti sono stati successivamente sacrificati e, prelevato il fegato, è stata ricavata la frazione citosolica e microsomiale. Con l'impiego di quest'ultima sono state determinate mediante tecniche spettrofotometriche e spettrofluorimetriche le attività di alcuni CYPs e della reduttasi associata utilizzando differenti substrati come *probes* specifici per le diverse isoforme (Tab. 7.1).

Substrati	Enzimi
Citocromo c	reduttasi
amminopirina	CYP3A1/2
p-nitrofenolo	CYP2E1
etossiresorufina	CYP1A1
metossiresorufina	CYP1A2
pentossiresorufina	CYP2B1/2

etossicumarina	CYP1A1/2, 2A, 2B, 2E1
----------------	-----------------------

Tabella 7.1. Substrati impiegati per le diverse isoforme.

A conferma dei risultati ottenuti, laddove mediante l'utilizzo di substrati specifici/preferenziali è stata riscontrata una marcata modulazione (dieta *5 a day* e singola porzione della mono-dieta della lattuga), è stato inoltre utilizzato il testosterone come *multiprobe*, in quanto viene idrossilato in maniera regio- e stereoselettiva dai diversi CYPs (Tab. 7.2) e consente quindi di determinare contemporaneamente l'attività di più isoforme.

Metaboliti del testosterone/attività associate	Isoforma di CYP
7 α -idrossitestosterone (7 α -OHT)	2A1
6 β -idrossitestosterone (6 β -OHT)	1A1/2 – 2C11/13 - 3A1
16 α -idrossitestosterone (16 α -OHT)	2B1 - 2C7/11/13
2 α -idrossitestosterone (2 α -OHT)	2C11
2 β -idrossitestosterone (2 β -OHT)	1A1 - 3A1/2
4-androsten-3,17-dione (17-OT)	2B1/2 – 2C
7 α -idrossitestosterone (7 α -OHT)	2A1
6 β -idrossitestosterone (6 β -OHT)	1A1/2 – 2C11/13 - 3A1

Tabella 7.2. Metaboliti del testosterone generati dalle diverse isoforme CYP.

Tali metaboliti sono facilmente separabili e rilevabili attraverso la tecnica cromatografica HPLC, collegata ad un detector UV che esegue la rilevazione alla lunghezza d'onda di 254 nm.

La capacità delle supplementazioni a base di frutta e/o verdura di modulare l'attività degli enzimi di fase II è stata studiata attraverso la

determinazione della glutatione S-transferasi e della UDP-glucuronosiltransferasi, principali “rappresentanti” degli enzimi post-ossidativi.

In collaborazione con il laboratorio di Farmacogenetica e Metabolismo dei Farmaci del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR) di Pisa, mediante tecniche spettrofotometriche, sulla frazione citosolica epatica è stata inoltre studiata la modulazione delle difese antiossidanti attraverso la determinazione della catalasi, GSH perossidasi, superossido dismutasi (SOD), GSH reduttasi e DT-diaforasi (NADPH chinone ossidoreduttasi 1). Inoltre, al fine di indagare i meccanismi molecolari alla base delle variazioni riscontrate, sono state impiegate tecniche di *Western blot* ed RT-PCR convenzionale per analizzare l'espressione genica dei CYPs o degli enzimi antiossidanti la cui attività catalitica ha risentito maggiormente delle supplementazioni somministrate.

Per approfondire ulteriormente i meccanismi implicati nella modulazione riscontrata a carico dell'attività di alcuni enzimi antiossidanti e per analizzare la possibile variazione dei livelli sistemici di ROS da parte delle supplementazioni vegetariane è stata compiuta una misura di stress ossidativo su plasma mediante il test dROMs.

Infine, il plasma ricavato da campioni di sangue prelevati dalla vena caudale dei ratti prima del sacrificio è stato utilizzato anche per la determinazione di alcuni dei più importanti parametri ematochimici (aspartato amminotransferasi o AST, alanina amminotransferasi o ALT, creatinina, glucosio, fruttosammine, trigliceridi, colesterolo totale, proteine totali, albumina, albumina/globuline).

I risultati si intendono espressi come variazione percentuale del trattato rispetto al controllo e ogni valore rappresenta la media \pm deviazione *standard* di sei esperimenti indipendenti derivanti da sei differenti animali (Wilcoxon's *rank method* * $P < 0.05$ e ** $P < 0.01$).

7.2 Effetti delle supplementazioni a base di frutta e verdura sugli enzimi del *drug-metabolism*

7.2.1 Effetti delle supplementazioni mono-colore corrispondenti ad una porzione di frutta o verdura e di quella equivalente al 5 a day sugli enzimi di fase I

Nella Tabella 7.3 sono riportati i valori delle attività associate alle diverse isoforme espressi come media \pm deviazione standard di 6 esperimenti indipendenti. Nel grafico 1 sono riportati i risultati degli effetti del trattamento con liofilizzato di frutta e verdura su varie isoforme CYP in microsomi di fegato di ratto espressi come variazione percentuale del trattato rispetto al controllo.

Come si può notare, risulta evidente come tutti i trattamenti abbiano generato un complesso *pattern* di inattivazione, soprattutto la mono-dieta del colore verde a base di lattuga e la supplementazione *5 a day*. Entrambe, infatti, determinano una significativa riduzione ($P < 0.01$) del contenuto di P450. Quest'ultimo diminuisce anche in seguito alla somministrazione della dieta del colore rosso ($P < 0.05$) e giallo ($P < 0.01$) a base di pomodoro e pesca, rispettivamente. Le medesime considerazioni valgono anche per la NADPH-citocromo (P450)-c-reduttasi: lattuga e dieta *5 a day* ne determinano un calo del 50% e del 35% ($P < 0.01$), rispettivamente. Più modesta è invece la variazione esercitata da pesca (-22%, $P < 0.01$), uva nera (-17%, $P < 0.05$) e cipolla (-8%, $P < 0.05$). L'attività associata all'isoforma CYP3A1/2 (APND) si riduce del 41% ($P < 0.01$) per effetto della somministrazione della supplementazione *5 a day*, mentre pesca e lattuga esercitano effetti più modesti (-17% e -19%, $P < 0.01$, rispettivamente). Anche per quello che riguarda l'attività l'isoforma CYP2E1 (pNFI), l'effetto più importante è determinato dalla dieta *5 a day* e del colore verde: si è registrato infatti un decremento di 2,5 e 1,5 volte, rispettivamente ($P < 0.01$). La EROD, MROD e la PROD si dimezzano ($P < 0.01$) per via della supplementazione *5 a day*. L'attività del CYP1A1 (EROD) subisce un decremento del 17% ($P < 0.05$), 26% ($P < 0.01$) e 13%

($P < 0.05$) anche per effetto delle mono-diete del colore giallo, verde e viola, rispettivamente. La reazione di monoossigenazione CYP2B1/2-dipendente (PROD) si dimezza anche come conseguenza della somministrazione del liofilizzato di lattuga e uva nera ($P < 0.01$). La dealchilazione dell'etossicumarina dipendente dai CYP1A1/2, 2A, 2B e 2E1 conferma il *trend* di forte inattivazione enzimatica riscontrata con i substrati specifici come conseguenza della somministrazione della supplementazione *5 a day* (un decremento di circa 2 volte, $P < 0.01$) e delle mono-diete a base di pesca e lattuga (-34 e -28%, $P < 0.01$, rispettivamente).

7.2.2 Effetti delle supplementazioni mono-colore corrispondenti a cinque porzioni di frutta o verdura sugli enzimi di fase I

Nella Tabella 7.4 sono riportati i valori associati alle diverse isoforme espresse come media \pm deviazione standard di 6 esperimenti indipendenti. Nel grafico 2 sono riportati i risultati degli effetti del trattamento con liofilizzato di frutta e verdura su varie isoforme CYP in microsomi di fegato di ratto espressi come variazione percentuale del trattato rispetto al controllo.

La somministrazione delle supplementazioni mono-colore corrispondenti a cinque porzioni di frutta o verdura ha determinato una lieve o trascurabile modulazione dell'attività delle principali isoforme CYP. In particolare, il contenuto di P450 diminuisce del 25% ($P < 0.01$) e del 19% ($P < 0.01$) per via delle supplementazioni a base di pesca e cipolla, rispettivamente. L'attività della NADPH-citocromo (P450)-c-reduttasi decresce lievemente per effetto dell'uva nera e della cipolla (-12 e -7,5%, $P < 0.01$, rispettivamente). La reazione di monoossigenazione CYP2E1-dipendente risente della mono-dieta del colore bianco (-17%, $P < 0.05$). L'EROD, attività CYP1A1-dipendente, aumenta come conseguenza della somministrazione del liofilizzato di uva nera (16%, $P < 0.05$). La lattuga determina invece una riduzione dell'attività del CYP1A2 del

13% ($P < 0.01$). Modesta è anche la modulazione dell'attività dei CYP2B1/2: si è registrato infatti un decremento del 18, 11, 19, 14 e 15% in seguito alla somministrazione delle mono-diete a base di pesca, pomodoro, lattuga, uva nera e cipolla, rispettivamente ($P < 0.01$). L'attività mista ECOD conferma la scarsa modulazione registrata con i substrati specifici: mentre lattuga e cipolla ne determinano una diminuzione rispettivamente del 9 e 13% ($P < 0.01$), l'uva nera ne causa un aumento del 15% ($P < 0.01$).

7.2.3 Effetti della supplementazione mono-colore corrispondente ad una porzione di lattuga e di quella equivalente al 5 a day sulla testosterone idrossilasi

Laddove con i substrati specifici sono state riscontrate le modulazioni più marcate (*5 a day* e lattuga), è stato utilizzato il testosterone come *multibioprobe* al fine di confermare i risultati ottenuti.

Nella Tabella 7.5 sono riportati i valori delle attività delle diverse isoforme espressi come media \pm deviazione standard di 6 esperimenti indipendenti. Nel grafico 3 sono riportati i risultati degli effetti del trattamento con liofilizzato di frutta e verdura sulla testosterone idrossilasi in microsomi di fegato di ratto espressi come variazione percentuale del trattato rispetto al controllo.

La modulazione associata conferma il generalizzato effetto di inattivazione esercitato dalle supplementazioni a base di frutta e verdura sulle isoforma CYP.

Il 7α -idrossitestosterone si riduce del 30 e del 10% ($P < 0.01$) per via della supplementazione *5 a day* e della lattuga, rispettivamente. L'idrossilazione in posizione 6β (CYP1A1/2, 2C11/13, 3A1) si dimezza ($P < 0.01$) in seguito alla somministrazione della dieta multi-colore, mentre cala del 38% ($P < 0.01$) per effetto della singola porzione di lattuga. Il metabolita 16α diminuisce del 60% ($P < 0.01$) per via di entrambe le supplementazioni. L'idrossilazione in posizione 2α del testosterone generata dal CYP2C11, isoforma preponderante

nel fegato di ratto, si riduce del 58% ($P < 0.01$) a causa della dieta *5 a day* e del 54% per via di quella a base di lattuga. Gli effetti maggiori si sono registrati a carico della reazione catalizzata dai CYP1A1, 3A1/2 (idrossilazione in posizione 2 β) con un decremento di circa il 70% ($P < 0.01$) in seguito alla somministrazione di entrambe le supplementazioni. Infine, anche il 4-androsten-3,17-dione, dipendente dai CYP2B1/2, 2C, si dimezza ($P < 0.01$) per effetto di entrambe le diete.

7.2.4 Effetti delle supplementazioni mono-colore corrispondenti ad una porzione di frutta o verdura e di quella equivalente al 5 a day sugli enzimi di fase II

Nella Tabella 7.6 sono riportati i valori delle attività di alcuni enzimi di fase II espressi come media \pm deviazione standard di 6 esperimenti indipendenti. Nel grafico 4 sono riportati i risultati degli effetti del trattamento con liofilizzato di frutta e verdura sui principali rappresentanti del metabolismo post-ossidativo, GST e UDPGT, in citosol e microsomi di fegato di ratto espressi come variazione percentuale del trattato rispetto al controllo.

Gli effetti della frutta e della verdura sulla fase II sono modesti. La supplementazione relativa al *5 a day* inattiva del 19% la GST ($P < 0.01$), l'attività di quest'ultima diminuisce del 22% anche in seguito alla somministrazione della lattuga ($P < 0.01$). L'UDPGT risente della dieta del colore rosso a base di pomodoro, che ne determina un incremento del 55% ($P < 0.01$) e della supplementazione *5 a day* che, invece, causa un'inattivazione del 26% ($P < 0.05$).

7.2.5 Effetti delle supplementazioni mono-colore corrispondenti a cinque porzioni di frutta o verdura sugli enzimi di fase II

Nella Tabella 7.7 sono riportati i valori delle attività di alcuni enzimi di fase II espressi come media \pm deviazione standard di 6 esperimenti

indipendenti. Nel grafico 5 sono riportati i risultati degli effetti del trattamento su GST e UDPGT, in citosol e microsomi di fegato di ratto espressi come variazione percentuale del trattato rispetto al controllo.

Anche gli effetti delle supplementazioni corrispondenti a cinque porzioni sono molto moderati. La GST risente maggiormente della supplementazione a base di cipolla con un incremento del 35% ($P < 0.01$), mentre le mono-diete del colore giallo, rosso, verde e viola ne determinano un aumento di circa il 15% ($P < 0.05$).

La cipolla causa un incremento dell'UDPGT (31%, $P < 0.01$), mentre la lattuga esercita l'effetto opposto (-18,5%, $P < 0.01$).

7.3 Effetti delle supplementazioni a base di frutta e verdura su enzimi antiossidanti

7.3.1 Effetti delle supplementazioni mono-colore corrispondenti ad una porzione di frutta o verdura e di quella equivalente al 5 a day su enzimi antiossidanti

Nella Tabella 7.8 sono riportati i valori delle attività di enzimi antiossidanti espressi come media \pm deviazione standard di 6 esperimenti indipendenti. Nel grafico 6 sono riportati i risultati degli effetti del trattamento con liofilizzato in citosol di fegato di ratto espressi come variazione percentuale del trattato rispetto al controllo.

Fatta eccezione per la DT-diaforasi, indotta di 2,5 e 2,7 volte rispettivamente dalle supplementazioni *5 a day* e a base di lattuga ($P < 0.01$), gli enzimi antiossidanti non hanno risentito in particolar modo delle diete vegetariane. La catalasi viene inattivata del 15% dalla supplementazione *5 a day* ($P < 0.05$), mentre quella a base di lattuga ne determina un'induzione della stessa entità ($P < 0.01$). La GSH perossidasi risente in modo significativo ($P < 0.05$) della sola dieta del colore verde con un aumento del 36%. Mentre le somministrazioni di pesca e pomodoro hanno entrambe determinato

un incremento della superossido dismutasi del 25% ($P<0.05$), la lattuga ha causato un'inattivazione della stessa entità ($P<0.05$). La GSH reduttasi diminuisce del 17% ($P<0.05$) per effetto della supplementazione *5 a day*.

7.3.2 Effetti delle supplementazioni mono-colore corrispondenti a cinque porzioni di frutta o verdura su enzimi antiossidanti

Nella Tabella 7.9 sono riportati i valori delle attività dei principali enzimi antiossidanti espressi come media \pm deviazione standard di 6 esperimenti indipendenti. Nel grafico 7 sono riportati i risultati degli effetti del trattamento con liofilizzato in citosol di fegato di ratto espressi come variazione percentuale del trattato rispetto al controllo. Anche le supplementazioni corrispondenti a cinque porzioni di vegetali hanno determinato scarse variazioni a carico degli enzimi antiossidanti. Le diete del colore rosso, viola e bianco hanno inattivato la catalasi del 27% ($P<0.01$) e del 12 % ($P<0.05$), rispettivamente. La GSH perossidasi risente della sola somministrazione della pesca con un decremento del 20% ($P<0.05$). Fra gli enzimi antiossidanti, gli effetti maggiori si sono riscontrati a carico della superossido dismutasi: pesca, pomodoro, lattuga, uva nera e cipolla hanno causato un decremento del 45, 41, 43 50 e 53% ($P<0.01$), rispettivamente. La supplementazione corrispondente a cinque porzioni di cipolla induce la GSH reduttasi del 26% ($P<0.01$). Infine, la DT-diaforasi subisce un decremento del 20% ($P<0.01$) per effetto della pesca, mentre la cipolla ne determina un'induzione del 28% ($P<0.01$).

7.4 Western blot: effetti delle supplementazioni mono-colore corrispondenti ad una porzione di frutta o verdura e di quella equivalente al 5 a day sui livelli proteici degli enzimi del *drug-metabolism* di fase I

Laddove si sono riscontrate le variazioni più significative a carico dell'attività degli enzimi del *drug-metabolism* (supplementazioni mono-colore corrispondenti ad una porzione di frutta o verdura e dieta 5 a day), è stata impiegata la tecnica del *Western blot* per indagare i possibili meccanismi alla base delle inattivazioni registrate.

In figura 7.1 sono riportati, a titolo esemplificativo, i risultati dell'esperimento maggiormente rappresentativo dei sei esperimenti indipendenti condotti in microsomi di fegato di sei differenti ratti; tutti hanno dato esito simile a quello rappresentato in figura. Sono inoltre riportati i valori dell'analisi densitometrica espressi come media \pm deviazione standard dei 6 esperimenti indipendenti. A risentire maggiormente delle supplementazioni, sono i livelli proteici dei CYP1A1/2. Infatti, in base all'analisi densitometrica, la supplementazione 5 a day ne determinano una riduzione di circa 4 volte ($P < 0.01$); la pesca e il pomodoro ne causano un decremento del 42 e del 28% ($P < 0.01$), rispettivamente; infine lattuga e uva riducono il quantitativo proteico di CYP1A1/2 di circa il 50% ($P < 0.01$). I livelli di CYP2B1/2 sembrano risentire della supplementazione 5 a day, che ne determina un calo del 40% ($P < 0.01$) e di quella a base di pomodoro, che causa un incremento del 34% ($P < 0.01$). Il contenuto proteico del CYP2E1 diminuisce del 53 ($P < 0.01$), 15 ($P < 0.05$), 33 e 35% ($P < 0.01$) a causa delle supplementazione 5 a day, pesca, lattuga e uva, rispettivamente. I CYP3A1/2 sembrano risentire della dieta 5 a day con una riduzione di circa il 30% ($P < 0.01$) e di quella del colore viole con un aumento del 16% ($P < 0.05$).

7.5 RT-PCR: effetti della supplementazione mono-colore corrispondente ad una porzione di lattuga e di quella equivalente al 5 a day sui livelli di mRNA degli enzimi del *drug-metabolism* di fase I ed antiossidanti

Sulla base dei risultati ottenuti nei saggi enzimatici e *Western Blot*, è stata impiegata la tecnica dell'RT-PCR per studiare l'espressione epatica dell'mRNA laddove si sono riscontrate le variazioni di attività catalitica o dei livelli proteici più significativi a carico degli enzimi del *drug-metabolism* ed antiossidanti (supplementazione mono-colore corrispondenti ad una porzione di lattuga e di quella equivalente al 5 a day).

Si vuole sottolineare che i dati di RT-PCR per i geni studiati siano di tipo qualitativo. Pur avendo normalizzato i dati con il gene *housekeeping* beta-actina, si può parlare di inattivazione/induzione solo quando il gene in esame è presente/assente nei controlli ed assente/presente nei trattati o sia evidente una marcata differenza tra i relativi segnali. In tutti gli altri casi, i dati sono indicativi e devono essere confermati da un'analisi di tipo quantitativo (*real time*-PCR).

In figura 7.2 sono riportati, a titolo esemplificativo, i risultati relativi all'esperimento di RT-PCR maggiormente rappresentativo dei sei esperimenti indipendenti condotti nel fegato di sei differenti ratti; tutti hanno dato esito simile a quello rappresentato in figura. I risultati suggeriscono che le variazioni esercitate dalla supplementazione equivalente al 5 a day sul *drug-metabolism* sono probabilmente ascrivibili ad un effetto a livello trascrizionale. Evidente è infatti la diminuzione dell'mRNA dei CYP1A1/2, 2B1/2 e 2E1. Forte è invece l'induzione trascrizionale a carico di DT-diaforasi ed eme-ossigenasi. Per quello che riguarda la supplementazione a base di lattuga, le uniche variazioni evidenti sono state riscontrate a carico dell'isoforma CYP2B1, DT-diaforasi ed eme-ossigenasi.

7.6 dROMs test: effetti delle supplementazioni a base di frutta e verdura sui livelli sistemici di ROS

7.6.1 Effetti delle supplementazioni mono-colore corrispondenti ad una porzione di frutta o verdura e di quella equivalente al 5 a day sui livelli sistemici di ROS

Nella Tabella 7.10 sono riportati i valori di unità Caratelli come media \pm deviazione standard di 6 esperimenti indipendenti. Nel grafico 8 sono riportati i risultati degli effetti del trattamento con liofilizzato sullo stress ossidativo nel plasma di ratto espressi come variazione percentuale del trattato rispetto al controllo.

Le supplementazioni a base di vegetali determinano un forte aumento della presenza di ROS nel plasma dei ratti trattati. Gli effetti più pronunciati si verificano come conseguenza della somministrazione delle diete *5 a day* e della lattuga con un incremento di H₂O₂/dl di 6,6 e 10 volte (P<0.01), rispettivamente. Un aumento dello stress ossidativo del 248% (P<0.01) si verifica per effetto della pesca, mentre la cipolla lo aumenta del 113% (P<0.01). Infine, pomodoro e uva nera esercitano gli effetti più blandi con un incremento della presenza di ROS del 108 e 79% (P<0.01), rispettivamente.

7.6.2 Effetti delle supplementazioni mono-colore corrispondenti a cinque porzioni di frutta o verdura sui livelli sistemici di ROS

Nella Tabella 7.11 sono riportati i valori di unità Caratelli come media \pm deviazione standard di 6 esperimenti indipendenti. Nel grafico che segue 9 sono riportati i risultati degli effetti del trattamento con liofilizzato sullo stress ossidativo nel plasma di ratto espressi come variazione percentuale del trattato rispetto al controllo.

Le supplementazioni corrispondenti a cinque porzioni di vegetali causano invece effetti molto blandi sulla variazione dei livelli di ROS a livello sistemico. Mentre lattuga e uva nera non variano

significativamente il livello di ROS nel plasma, la supplementazione con liofilizzato di pesca diminuisce di 1,6 volte la presenza di specie reattive dell'ossigeno a livello sistemico ($P<0.05$). Il pomodoro determina un decremento del 25% ($P<0.05$) dei mg di H_2O_2 /dl di plasma. Infine, la cipolla agisce abbassando di quasi 2 volte ($P<0.01$) lo stress ossidativo plasmatico, sistemico.

7.7 Effetti delle supplementazioni a base di frutta e verdura sui principali parametri ematochimici

Per l'analisi sono stati considerati i seguenti parametri: transaminasi (aspartato aminotransferasi o AST, alanina aminotransferasi o ALT), creatinina, glucosio, fruttosammine, trigliceridi, colesterolo e proteine totali, albumina e albumina/globulina).

7.7.1 Effetti delle supplementazioni mono-colore corrispondenti ad una porzione di frutta o verdura e di quella equivalente al 5 a day sui principali parametri ematochimici

Nella Tabella 7.12 sono riportati i valori dei principali parametri ematochimici espressi come media \pm deviazione standard di 6 esperimenti indipendenti. Nel grafico 10 sono riportati i risultati degli effetti del trattamento con liofilizzato in plasma di ratto espressi come variazione percentuale del trattato rispetto al controllo.

L'AST diminuisce del 15% ($P<0.05$) per effetto delle supplementazioni a base di pesca e uva nera e del 12% ($P<0.05$) per via della dieta del colore rosso. L'ALT diminuisce del 22 ($P<0.05$), 27 ($P<0.01$) e 16% ($P<0.05$) in seguito alla somministrazione di pesca, lattuga o uva nera. I livelli di glucosio subiscono un decremento di circa il 12% ($P<0.05$) per effetto della lattuga e dell'uva nera. I trigliceridi aumentano del 14 e 13% ($P<0.05$) negli animali trattati con le supplementazioni 5 a day e della lattuga. I ratti che hanno ricevuti liofilizzato di lattuga hanno mostrato un aumento dei livelli di

colesterolo totale del 18% ($P < 0.05$) ed una diminuzione del rapporto albumina/globuline del 27% ($P < 0.01$). Vi è da precisare che tali fluttuazioni dei parametri considerati negli animali trattati con frutta o verdura rispetto ai controlli, statisticamente significative in alcuni casi, non risultano biologicamente rilevanti poiché i valori determinati ricadono sempre all'interno degli intervalli di riferimento (Matsuzawa e altri, 1997; Petterino e Argentino-Storino, 2006) per il ratto maschio del ceppo *Sprague-Dawley*.

7.7.2 Effetti delle supplementazioni mono-colore corrispondenti a cinque porzioni di frutta o verdura sui principali parametri ematochimici

Nella Tabella 7.13 sono riportati i valori dei principali parametri ematochimici espressi come media \pm deviazione standard di 6 esperimenti indipendenti. Nel grafico 11 sono riportati i risultati degli effetti del trattamento con liofilizzato di frutta e verdura sugli stessi parametri in plasma di ratto espressi come variazione percentuale del trattato rispetto al controllo.

Le transaminasi ALT diminuiscono del 19% ($P < 0.05$) per via della supplementazione a base di uva nera. La dieta del colore bianco (cipolla) causa un aumento dei trigliceridi del 43% ($P < 0.01$). Anche in questo caso le fluttuazioni dei parametri considerati negli animali trattati con frutta o verdura rispetto ai controlli, statisticamente significative in alcuni casi, non risultano biologicamente rilevanti poiché i valori determinati ricadono sempre all'interno degli intervalli di riferimento (Matsuzawa e altri, 1997; Petterino e Argentino-Storino, 2006) per il ratto maschio del ceppo *Sprague-Dawley*.

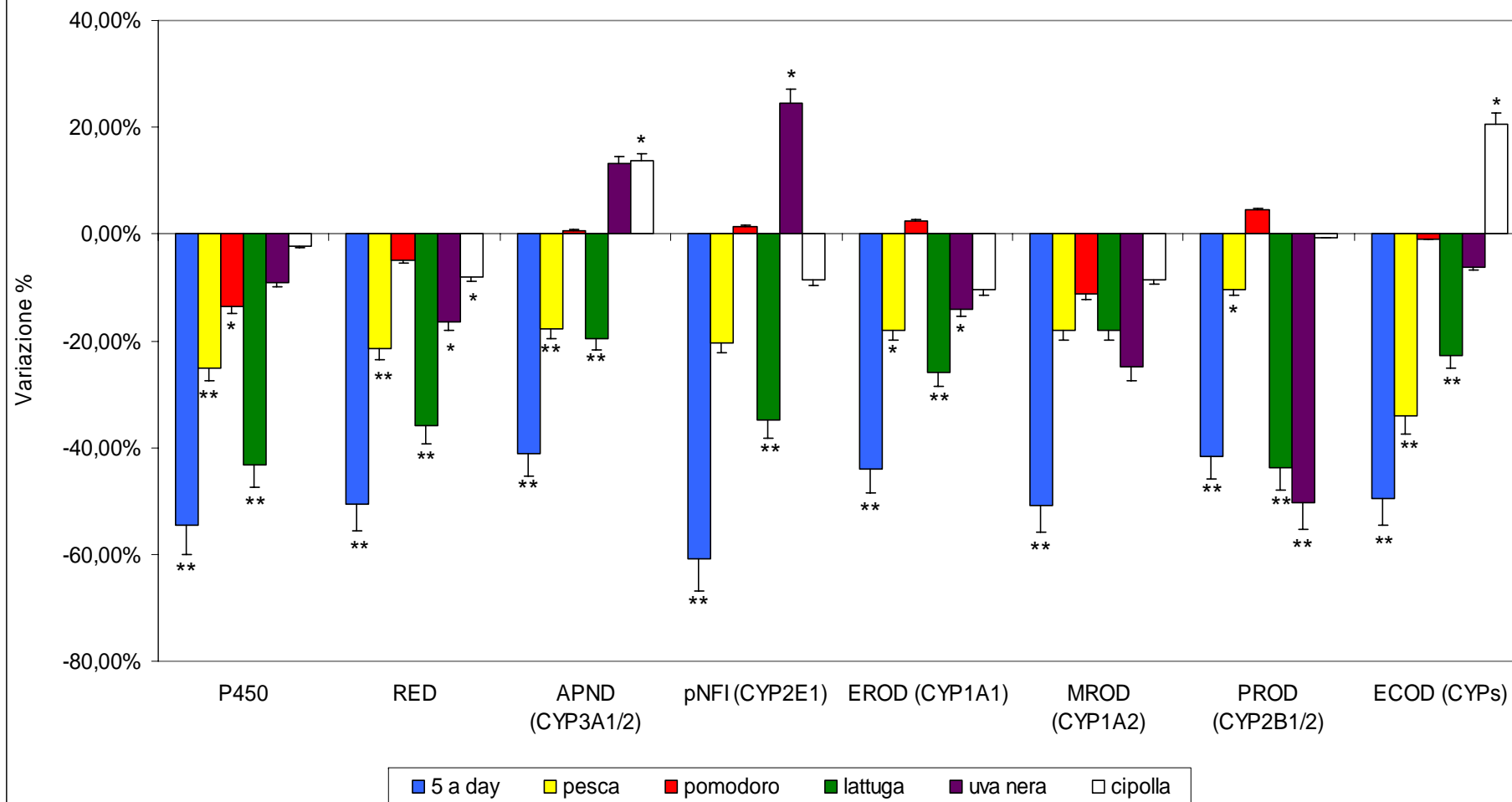
TABELLA 7.3 - EFFETTI DELLE SUPPLEMENTAZIONI MONO-COLORE CORRISPONDENTI AD UNA PORZIONE DI FRUTTA O VERDURA E DI QUELLA EQUIVALENTE AL 5 A DAY SUL SISTEMA MONOOSSIGENASICO IN MICROSOMI DI FEGATO DI RATTO

PARAMETRI (monoossigenasi associate)	CONTROLLO (VEICOLO)	5 A DAY	PESCA	POMORORO	LATTUGA	UVA NERA	CIPOLLA
CITOCROMO P450 (nmol x mg ⁻¹)	0.44 ± 0.03	0.20 ± 0.02 **	0.33 ± 0.03 **	0.38 ± 0.03 *	0.25 ± 0.02 **	0.40 ± 0.03	0.43 ± 0.04
NADPH-CITOCROMO (P450)-c-REDUTTASI (nmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹)	91.90 ± 6.67	45.45 ± 5.16**	77.22 ± 0.01**	87.34 ± 0.24	59.04 ± 0.52**	76.77 ± 1.22*	84.52 ± 3.67 *
AMMINOPIRINA N-DEMETILASI (CYP3A1/2) (nmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹)	5.40 ± 0.48	3.18 ± 0.27 **	4.44 ± 0.30 **	5.44 ± 0.25	4.34 ± 0.30 **	6.11 ± 0.52	6.14 ± 0.20 *
p-NITROFENOLO IDROSSILASI (CYP2E1) (nmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹)	0.69 ± 0.05	0.27 ± 0.03 **	0.55 ± 0.06	0.70 ± 0.03	0.45 ± 0.03 **	0.86 ± 0.07 *	0.63 ± 0.05
ETTOSSIRESORUFINA O-DEETILASI (CYP1A1) (pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹)	20.73 ± 0.48	11.60 ± 0.98**	17.00 ± 0.81*	21.24 ± 0.81	15.34 ± 0.72**	17.83 ± 0.56*	18.59 ± 1.48
METOSSIRESORUFINA O-DEMETILASI (CYP1A2) (pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹)	13.82 ± 1.06	6.81 ± 1.14 **	11.34 ± 1.58	12.28 ± 1.60	11.34 ± 1.64	10.38 ± 1.02	12.64 ± 0.80
PENTOSSIRESORUFINA O-DEALCHILASI (CYP2B1/2) (pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹)	12.10 ± 1.81	7.06 ± 0.72 **	10.83 ± 0.14 *	12.64 ± 0.83	6.82 ± 0.53 **	6.02 ± 0.70 **	12.03 ± 0.87
ETTOSSICUMARINA O-DEETILASI (MISTA) (pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹)	222.27 ± 9.11	112.31 ± 6.40**	146.67 ± 4.57**	220.15 ± 3.10	171.43 ± 14.74**	208.66 ± 10.47	268.03 ± 12.36*

I risultati sono la media ± deviazione standard di sei esperimenti indipendenti eseguiti su sei differenti animali.

* P < 0.05 e ** P < 0.01 rispetto al controllo, secondo il *rank method* di Wilcoxon.

Grafico 1 - Effetti delle supplementazioni mono-colore corrispondenti ad una porzione di frutta o verdura e di quella equivalente al 5 a day sul sistema monoossigenasico in microsomi di fegato di ratto



* P < 0.05 e ** P < 0.01 rispetto al controllo, secondo il *rank method* di Wilcoxon.

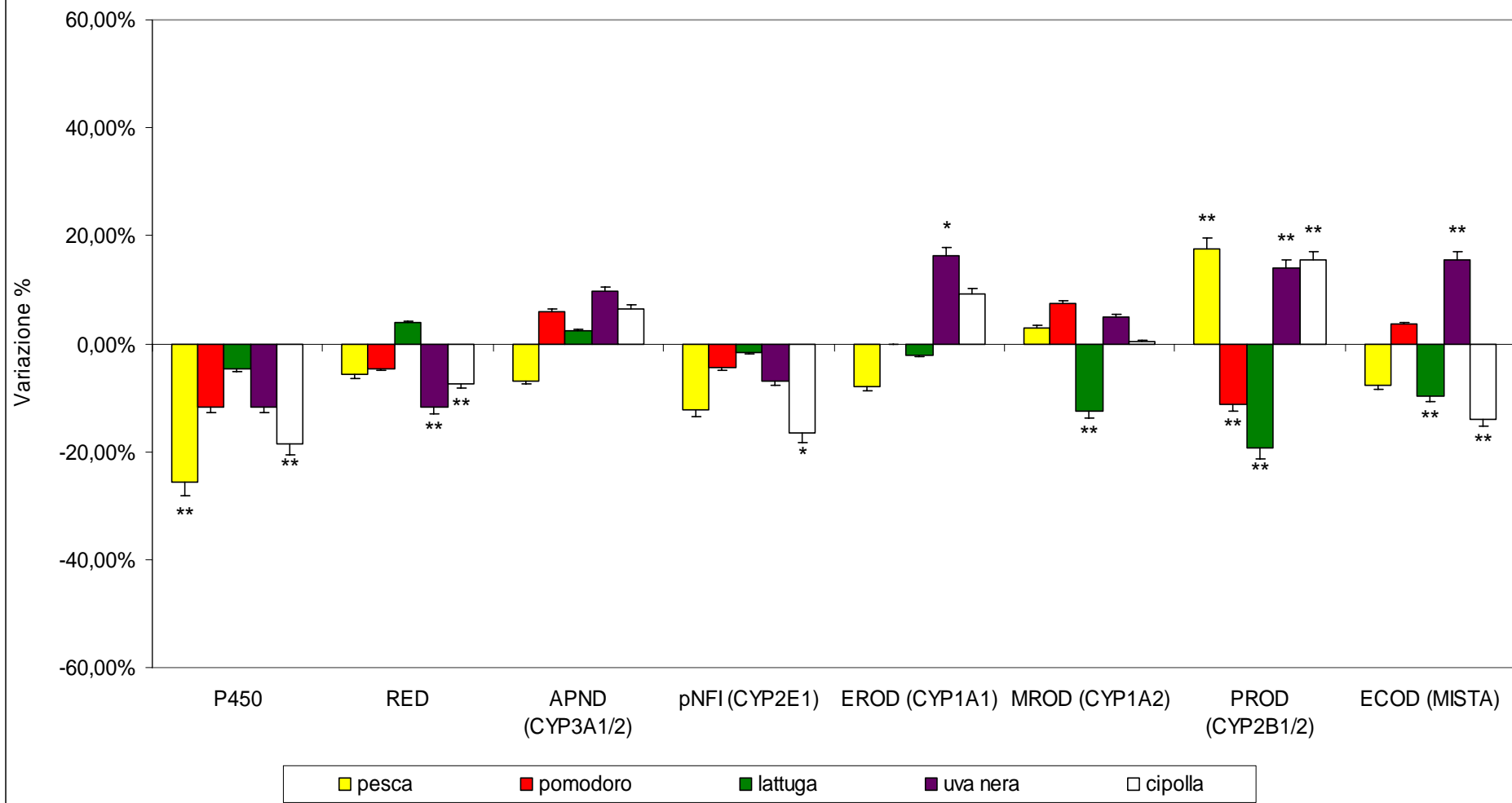
TABELLA 7.4 - EFFETTI DELLE SUPPLEMENTAZIONI MONO-COLORE CORRISPONDENTI A CINQUE PORZIONI DI FRUTTA O VERDURA SUL SISTEMA MONOSSIGENASICO IN MICROSOMI DI FEGATO DI RATTO

PARAMETRI (monoossigenasi associate)	CONTROLLO (VEICOLO)	PESCA	POMORORO	LATTUGA	UVA NERA	CIPOLLA
CITOCROMO P450 (nmol x mg ⁻¹)	0.43 ± 0.04	0.32 ± 0.3 **	0.38 ± 0.03	0.41 ± 0.02	0.38 ± 0.03	0.35 ± 0.01 **
NADPH-CITOCROMO (P450)-c-REDUTTASI (nmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹)	101.88 ± 3.77	96.02 ± 6.31	97.24 ± 2.12	105.76 ± 3.79	89.81 ± 5.68 **	94.17 ± 1.29 **
AMMINOPIRINA N-DEMETILASI (CYP3A1/2) (nmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹)	6.74 ± 0.26	6.28 ± 0.42	7.14 ± 0.56	6.90 ± 0.49	7.39 ± 0.16	7.18 ± 0.62
p-NITROFENOLO IDROSSILASI (CYP2E1) (nmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹)	1.14 ± 0.05	1.00 ± 0.04	1.09 ± 0.10	1.12 ± 0.10	1.06 ± 0.09	0.95 ± 0.09 *
ETTOSSIRESORUFINA O-DEETILASI (CYP1A1) (pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹)	30.37 ± 1.66	27.99 ± 1.64	30.32 ± 1.64	29.73 ± 2.81	35.32 ± 1.31 **	33.20 ± 3.03
METOSSIRESORUFINA O-DEMETILASI (CYP1A2) (pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹)	14.32 ± 1.10	14.75 ± 1.26	15.37 ± 0.94	12.52 ± 0.55 **	15.04 ± 0.93	14.39 ± 1.23
PENTOSSIRESORUFINA O-DEALCHILASI (CYP2B1/2) (pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹)	14.25 ± 0.98	16.77 ± 0.37 **	12.64 ± 0.13 **	11.50 ± 1.13 **	16.25 ± 0.50 **	16.47 ± 0.81 **
ETTOSSICUMARINA O-DEETILASI (MISTA) (pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹)	246.14 ± 12.18	226.99 ± 13.28	254.92 ± 18.00	222.33 ± 5.90**	284.36 ± 14.25**	211.87 ± 9.26**

I risultati sono la media ± deviazione standard di sei esperimenti indipendenti eseguiti su sei differenti animali.

* P < 0.05 e ** P < 0.01 rispetto al controllo, secondo il *rank method* di Wilcoxon.

Grafico 2 - Effetti delle supplementazioni mono-colore corrispondenti a cinque porzioni di frutta o verdura sul sistema monoossigenasico in microsomi di fegato di ratto



* P < 0.05 e ** P < 0.01 rispetto al controllo, secondo il *rank method* di Wilcoxon.

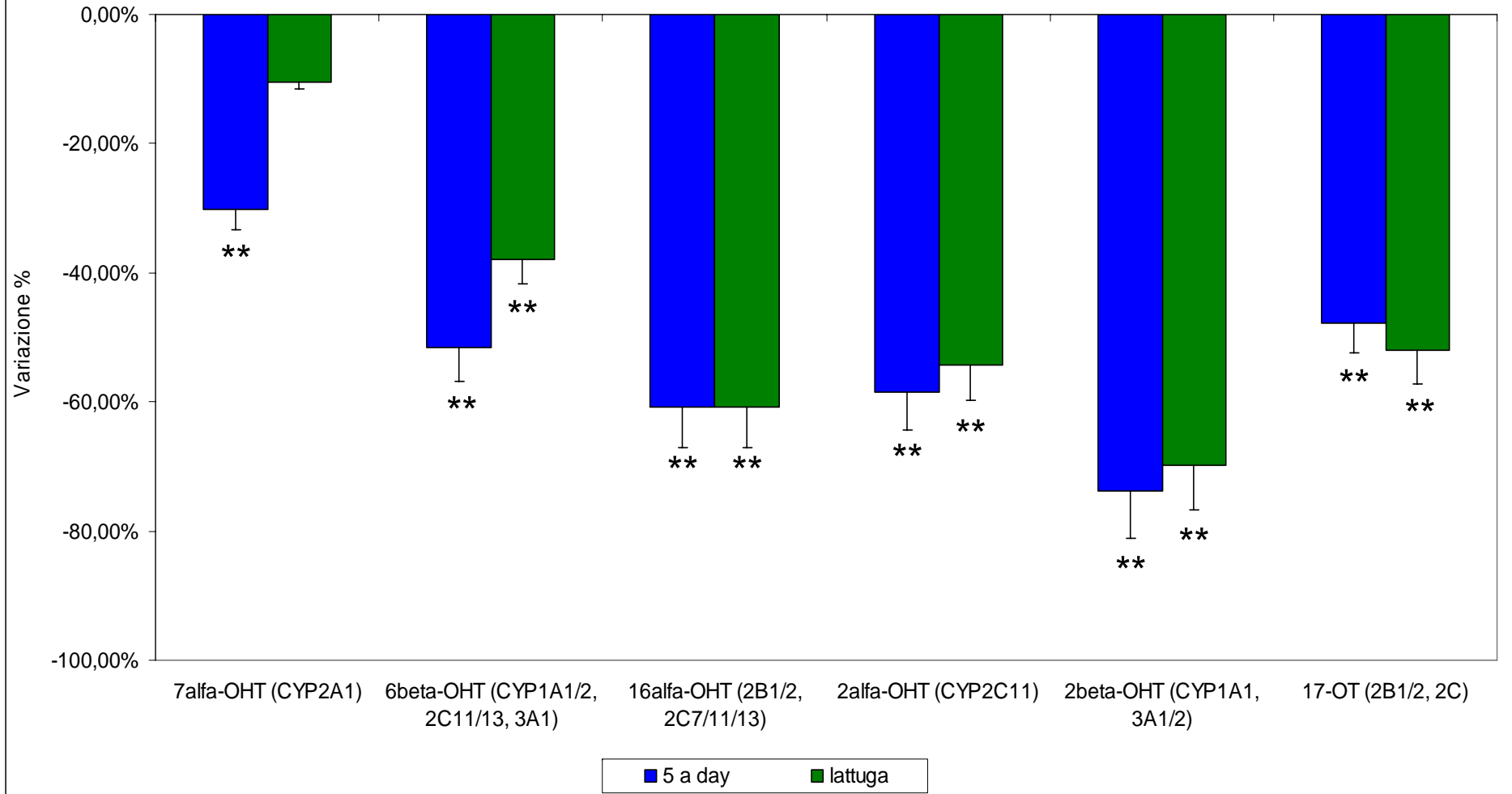
TABELLA 7.5 – EFFETTI DELLA SUPPLEMENTAZIONE MONO-COLORE CORRISPONDENTE AD UNA PORZIONE DI LATTUGA E DI QUELLA EQUIVALENTE AL 5 A DAY SULLA TESTOSTERONE IDROSSILASI IN MICROSOMI DI FEGATO DI RATTO

PARAMETRI (monoossigenasi associate)	CONTROLLO	5 A DAY	LATTUGA
7α-IDROSSITESTOSTERONE (pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹) (CYP2A1)	65.50 \pm 6.06	45.68 \pm 4.31**	59.64 \pm 5.33
6β-IDROSSITESTOSTERONE (pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹) (CYP1A1/2, 2C11/13, 3A1)	454.64 \pm 45.16	219.91 \pm 21.42 **	281.91 \pm 27.34 **
16α-IDROSSITESTOSTERONE (nmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹) (CYP2B1/2, 2C7/11/13)	1.56 \pm 0.15	0.61 \pm 0.05 **	0.61 \pm 0.06 **
2α-IDROSSITESTOSTERONE (nmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹) (CYP2C11)	1.18 \pm 0.08	0.49 \pm 0.04 **	0.54 \pm 0.04 **
2β-IDROSSITESTOSTERONE (pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹) (CYP1A1, 3A1/2)	83.55 \pm 6.90	21.86 \pm 2.20 **	25.28 \pm 2.43 **
4-ANDROSTEN-3,17-DIONE (pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹) (CYP2B1/2, 2C)	447.12 \pm 33.78	233.79 \pm 22.70 **	214.73 \pm 20.26 **

I risultati sono la media \pm deviazione standard di sei esperimenti indipendenti eseguiti su sei differenti animali.

* P < 0.05 e ** P < 0.01 rispetto al controllo, secondo il *rank method* di Wilcoxon.

Grafico 3 - Effetti della supplementazione mono-colore corrispondente ad una porzione di lattuga e di quella equivalente al 5 a day sulla testosterone idrossilasi



* P < 0.05 e ** P < 0.01 rispetto al controllo, secondo il *rank method* di Wilcoxon.

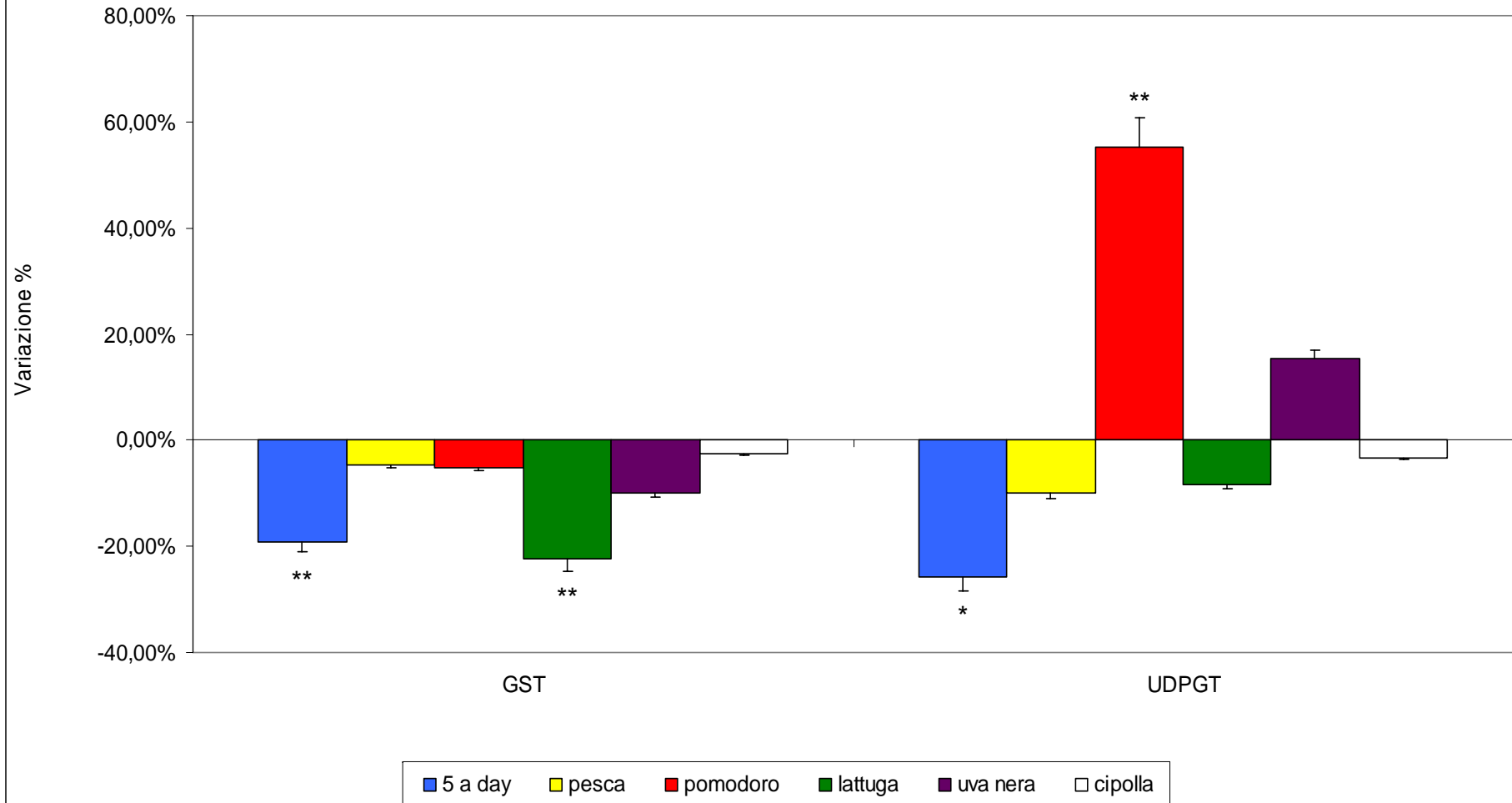
7.6 - EFFETTI DELLE SUPPLEMENTAZIONI MONO-COLORE CORRISPONDENTI AD UNA PORZIONE DI FRUTTA O VERDURA E DI QUELLA EQUIVALENTE AL 5 A DAY SUGLI ENZIMI DI FASE II IN CITOSOL O MICROSOMI DI FEGATO DI RATTO

PARAMENTRI	CONTROLLO (VEICOLO)	5 A DAY	PESCA	POMORORO	LATTUGA	UVA NERA	CIPOLLA
GLUTATIONE S-TRANSFERASI (nmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹)	11.76 ± 0.10	9.50 ± 0.62 **	11.20 ± 0.95	11.16 ± 1.44	9.13 ± 0.92 **	10.60 ± 0.84	11.47 ± 0.91
UDP-GLUCURONIL -TRANSFERASI (nmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹)	5.10 ± 0.87	3.78 ± 0.80 *	4.59 ± 0.55	7.92 ± 0.91 **	4.68 ± 0.67	5.89 ± 0.47	4.93 ± 0.24

I risultati sono la media ± deviazione standard di sei esperimenti indipendenti eseguiti su sei differenti animali.

*** P < 0.05 e ** P < 0.01 rispetto al controllo, secondo il *rank method* di Wilcoxon.**

Grafico 4 - Effetti delle supplementazioni mono-colore corrispondenti ad una porzione di frutta o verdura e di quella equivalente al 5 a day sugli enzimi di fase II in microsomi di fegato di ratto



* P < 0.05 e ** P < 0.01 rispetto al controllo, secondo il *rank method* di Wilcoxon.

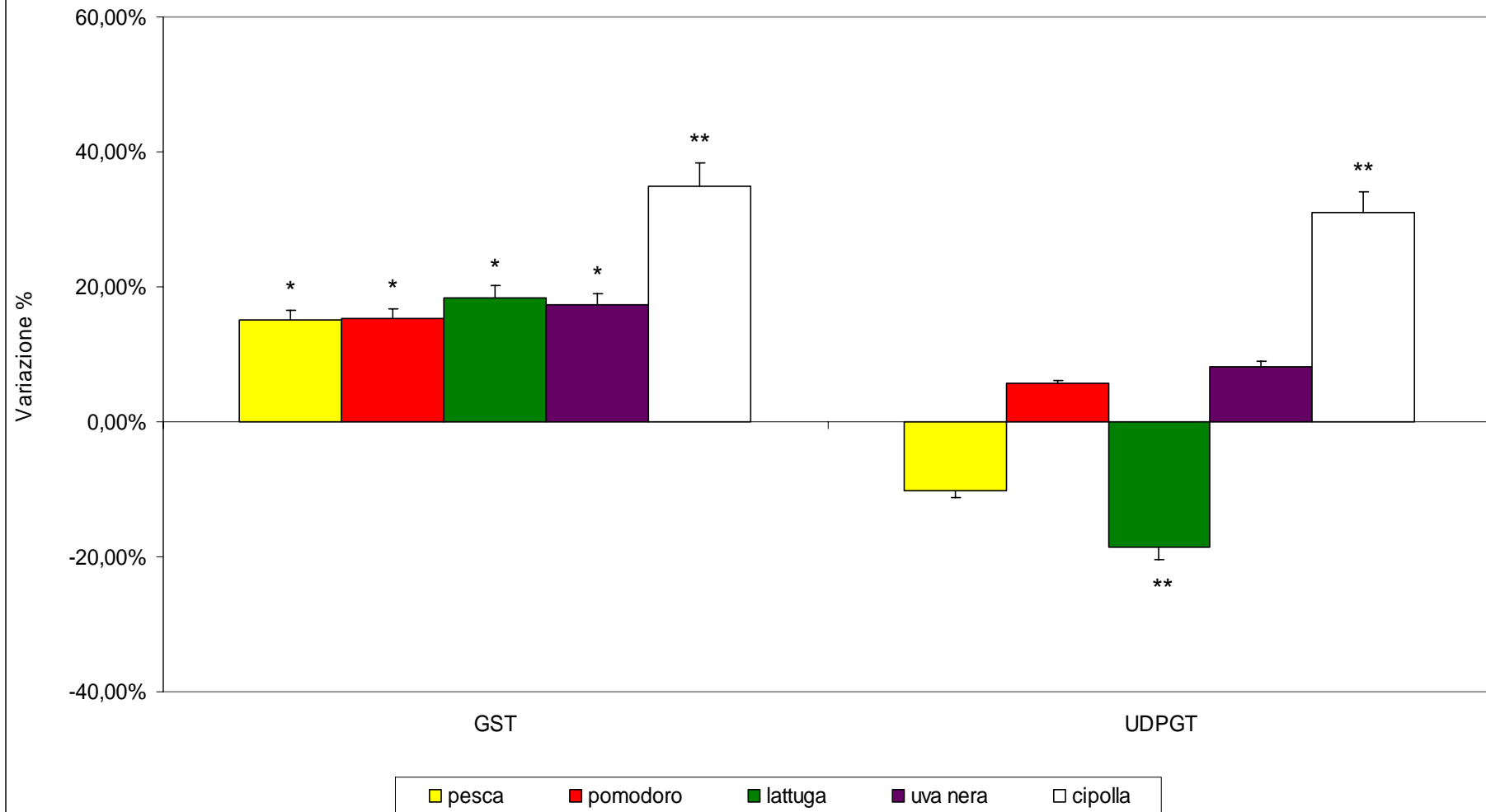
TABELLA 7.7 - EFFETTI DELLE SUPPLEMENTAZIONI MONO-COLORE CORRISPONDENTI A CINQUE PORZIONI DI FRUTTA O VERDURA SUGLI ENZIMI DI FASE II IN CITOSOL O MICROSOMI DI FEGATO DI RATTO

PARAMENTRI	CONTROLLO (VEICOLO)	PESCA	POMORORO	LATTUGA	UVA NERA	CIPOLLA
GLUTATIONE S-TRANSFERASI (nmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹)	6.55 ± 0.50	7.54 ± 0.55 *	7.55 ± 0.17 *	7.75 ± 0.74 *	7.68 ± 0.46 *	8.84 ± 0.87 **
UDP-GLUCURONIL -TRANSFERASI (nmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹)	4.81 ± 0.44	4.32 ± 0.27	5.08 ± 0.25	3.92 ± 0.13 **	5.20 ± 0.26	6.30 ± 0.62 **

I risultati sono la media ± deviazione standard di sei esperimenti indipendenti eseguiti su sei differenti animali.

* P < 0.05 e ** P < 0.01 rispetto al controllo, secondo il *rank method* di Wilcoxon.

Grafico 5 - Effetti delle supplementazioni mono-colore corrispondenti a cinque porzioni di frutta o verdura sugli enzimi di fase II in microsomi di fegato di ratto



* P < 0.05 e ** P < 0.01 rispetto al controllo, secondo il *rank method* di Wilcoxon

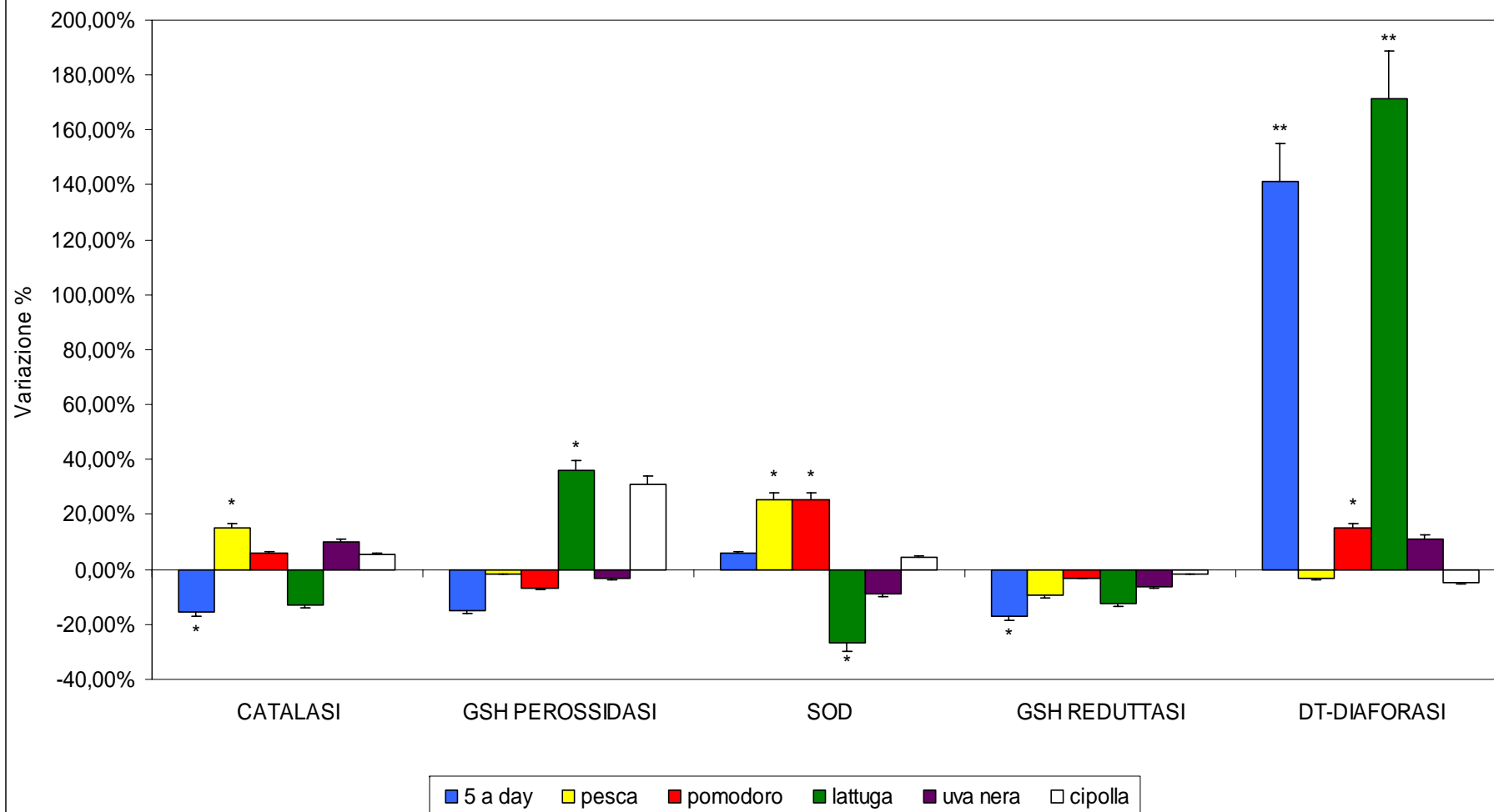
TABELLA 7.8 - EFFETTI DELLE SUPPLEMENTAZIONI MONO-COLORE CORRISPONDENTI AD UNA PORZIONE DI FRUTTA O VERDURA E DI QUELLA EQUIVALENTE AL 5 A DAY SUGLI ENZIMI ANTIOSSIDANTI IN CITOSOL DI FEGATO DI RATTO

PARAMENTRI	CONTROLLO (VEICOLO)	5 A DAY	PESCA	POMORORO	LATTUGA	UVA NERA	CIPOLLA
CATALASI (pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹)	435.11 ± 40.01	368.37 ± 35.50 *	500.42 ± 45.03 *	460.90 ± 47.20	379.06 ± 38.98	478.24 ± 45.54	458.56 ± 40.34
GSH PEROSSIDASI (nmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹)	61.43 ± 6.50	52.87 ± 5.80	60.56 ± 6.30	57.56 ± 5.22	83.56 ± 8.20 *	59.06 ± 5.18	80.98 ± 8.17
SUPEROSSIDO DISMUTASI (nmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹)	67.04 ± 6.15	71.54 ± 7.16	84.69 ± 8.18 *	84.54 ± 8.18 *	49.32 ± 5.15 *	61.03 ± 5.16	70.65 ± 7.14
GSH REDUTTASI (nmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹)	65.10 ± 6.10	54.45 ± 5.11 *	59.12 ± 6.13	63.43 ± 6.10	57.02 ± 5.11	61.11 ± 6.12	64.22 ± 6.10
DT-DIAFORASI (nmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹)	151.25 ± 16.07	364.43 ± 25.98 **	146.56 ± 13.98	174.04 ± 17.57 *	410.76 ± 39.96 **	168.43 ± 17.04 *	144.11 ± 13.99

I risultati sono la media ± deviazione standard di sei esperimenti indipendenti eseguiti su sei differenti animali.

*** P < 0.05 e ** P < 0.01 rispetto al controllo, secondo il *rank method* di Wilcoxon.**

Grafico 6 - Effetti delle supplementazioni mono-colore corrispondenti ad una porzione di frutta o verdura e di quella equivalente al 5 a day sugli enzimi antiossidanti in citosol di fegato di ratto



* P < 0.05 e ** P < 0.01 rispetto al controllo, secondo il *rank method* di Wilcoxon.

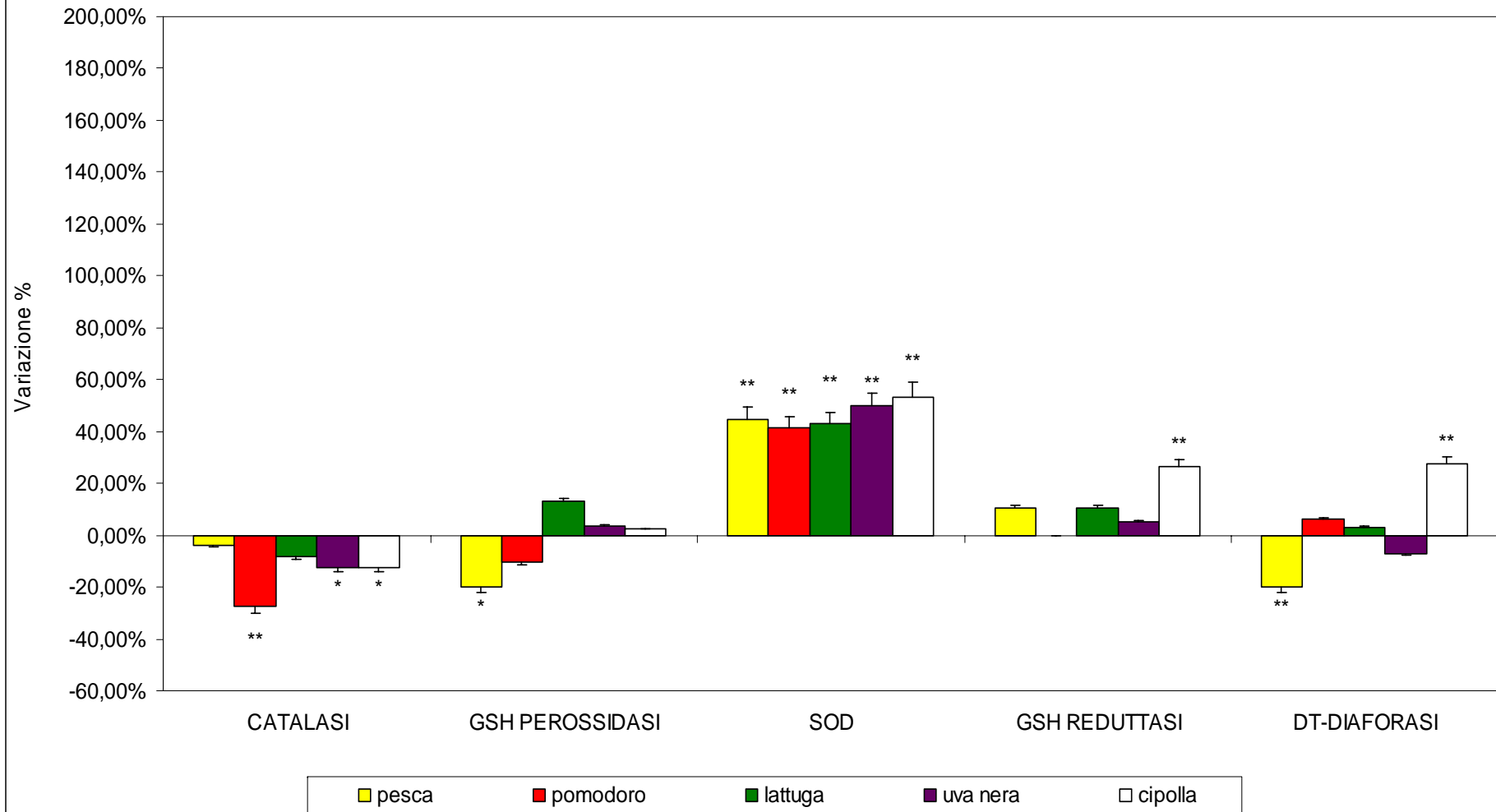
TABELLA 7.9 - EFFETTI DELLE SUPPLEMENTAZIONI MONO-COLORE CORRISPONDENTI A CINQUE PORZIONI DI FRUTTA O VERDURA SUGLI ENZIMI ANTIOSSIDANTI IN CITOSOL DI FEGATO DI RATTO

PARAMENTRI	CONTROLLO (VEICOLO)	PESCA	POMORORO	LATTUGA	UVA NERA	CIPOLLA
CATALASI (pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹)	572.34 ± 50.54	549.35 ± 40.32	416.86 ± 40.34 **	525.67 ± 40.04	500.56 ± 30.35 *	500.45 ± 30.56 *
GSH PEROSSIDASI (nmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹)	85.24 ± 8.15	68.09 ± 7.15 *	76.54 ± 7.18	96.12 ± 8.40	88.43 ± 8.15	87.34 ± 8.20
SUPEROSSIDO DISMUTASI (nmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹)	58.54 ± 4.98	84.21 ± 9.01**	82.01 ± 8.91**	83.34 ± 8.30**	87.53 ± 9,01**	89.53 ± 8.10**
GSH REDUTTASI (nmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹)	57.64 ± 5.37	63.45 ± 6.01	57.35 ± 6.00	63.34 ± 7.10	60.45 ± 5.80	72.56 ± 5.55**
DT-DIAFORASI (nmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹)	130.00 ± 12.56	104.34 ± 10.12 **	138.67 ± 12.98	134.45 ± 13.60	121.45 ± 13.08	166.09 ± 15.56 **

I risultati sono la media ± deviazione standard di sei esperimenti indipendenti eseguiti su sei differenti animali.

*** P < 0.05 e ** P < 0.01 rispetto al controllo, secondo il *rank method* di Wilcoxon.**

Grafico 7 - Effetti delle supplementazioni mono-colore corrispondenti a cinque porzioni di frutta o verdura sugli enzimi antiossidanti in citosol di fegato di ratto



* P < 0.05 e ** P < 0.01 rispetto al controllo, secondo il *rank method* di Wilcoxon.

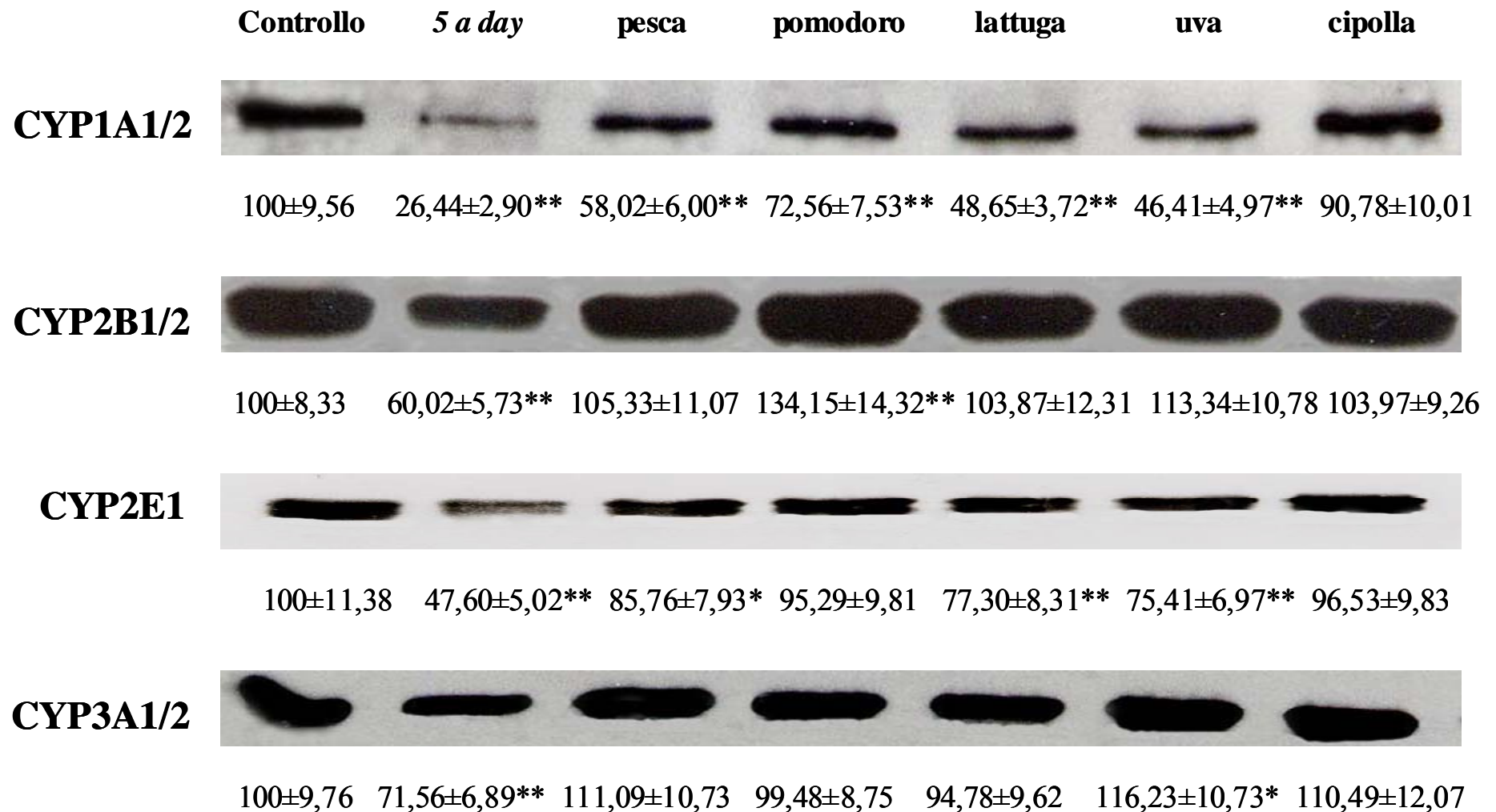


Figura 7.1. Effetti delle supplementazioni mono-colore corrispondenti ad una porzione di frutta o verdura e di quella equivalente al 5 a day sui livelli proteici di alcuni CYPs. Le immagini mostrate sono relative all'esperimento di *Western blot* maggiormente rappresentativo dei sei esperimenti indipendenti condotti in microsomi di fegato di sei differenti animali mediante anticorpi anti-CYP1A1/2, 2B1/2, 2E1 e 3A1/2 di ratto. L'analisi densitometrica riportata in figura è la media \pm deviazione standard di sei esperimenti indipendenti eseguiti su sei differenti animali. * $P < 0.05$ e ** $P < 0.01$ rispetto al controllo, secondo il *rank method* di Wilcoxon.

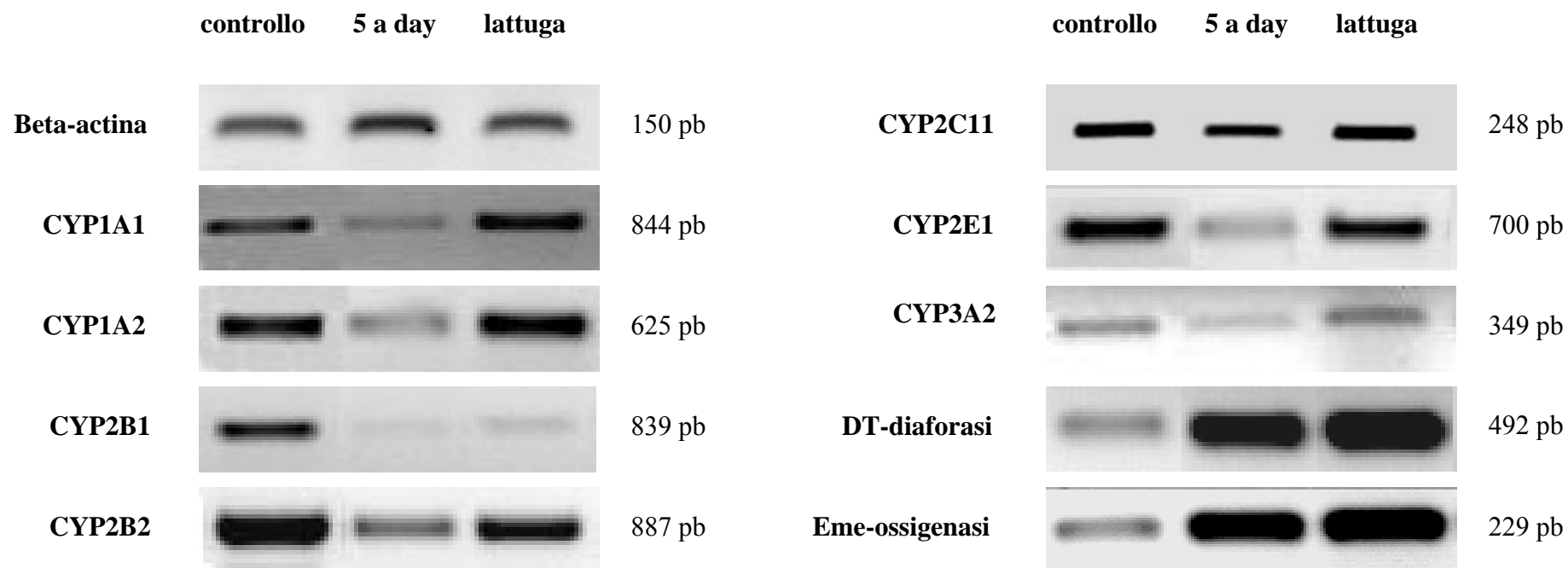


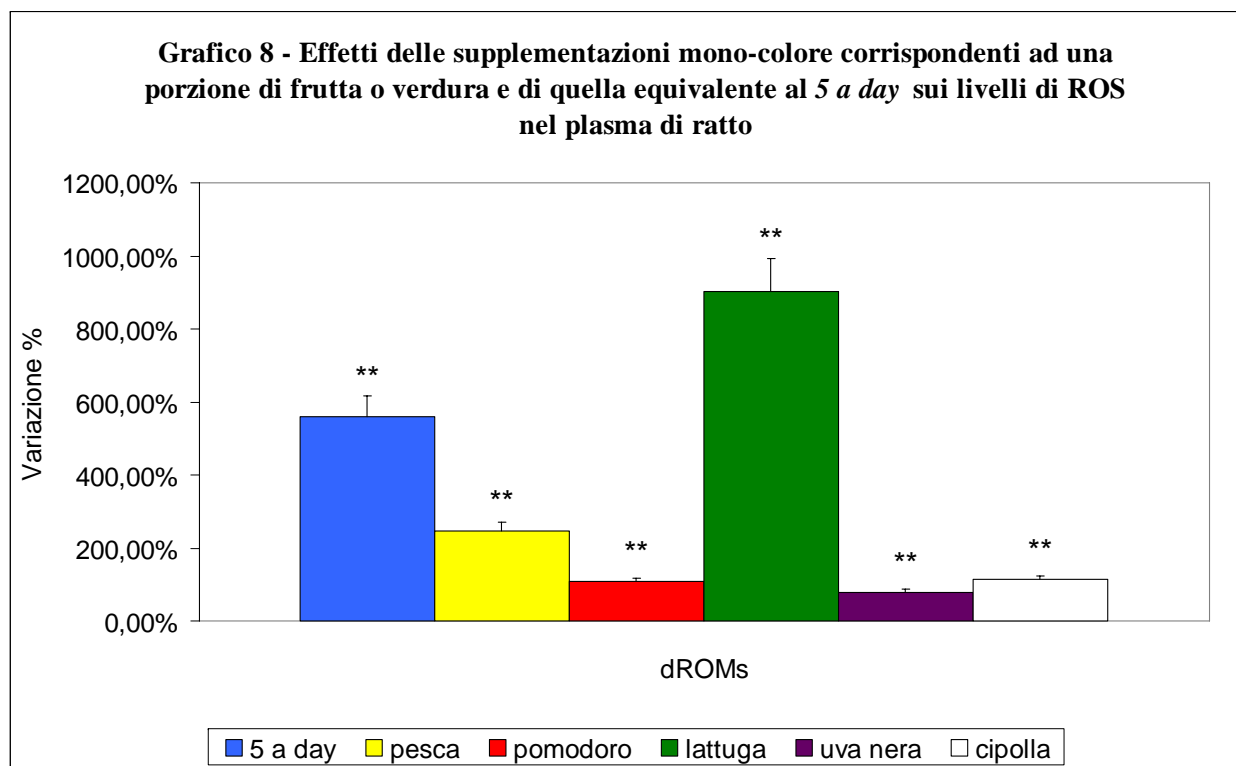
Figura 7.2. RT-PCR per alcune isoforme di citocromo P450 ed enzimi antiossidanti nel fegato di ratto trattato con la supplementazione mono-colore corrispondente ad una porzione di lattuga o con quella equivalente al *5 a day*. Le immagini mostrate sono relative all'esperimento di RT-PCR maggiormente rappresentativo dei sei esperimenti indipendenti condotti nel fegato di sei differenti ratti.

TABELLA 7.10 – EFFETTI DELLE SUPPLEMENTAZIONI MONO-COLORE CORRISPONDENTI AD UNA PORZIONE DI FRUTTA O VERDURA E DI QUELLA EQUIVALENTE AL 5 A DAY SUI LIVELLI SI ROS NEL PLASMA DI RATTO

PARAMETRO	CONTROLLO (VEICOLO)	5 A DAY	PESCA	POMORORO	LATTUGA	UVA NERA	CIPOLLA
dROMs (Unità Caratelli)	50.57 ± 5.70	333.84 ± 28.00**	174.96 ± 13.40**	105.05 ± 10.50**	506.34 ± 19.80**	90.52 ± 9.40**	107.77 ± 11.07**

I risultati (relativi a campioni diluiti 1:4) sono la media ± deviazione standard di sei esperimenti indipendenti eseguiti su sei differenti animali.

* P < 0.05 e ** P < 0.01 rispetto al controllo, secondo il *rank method* di Wilcoxon.



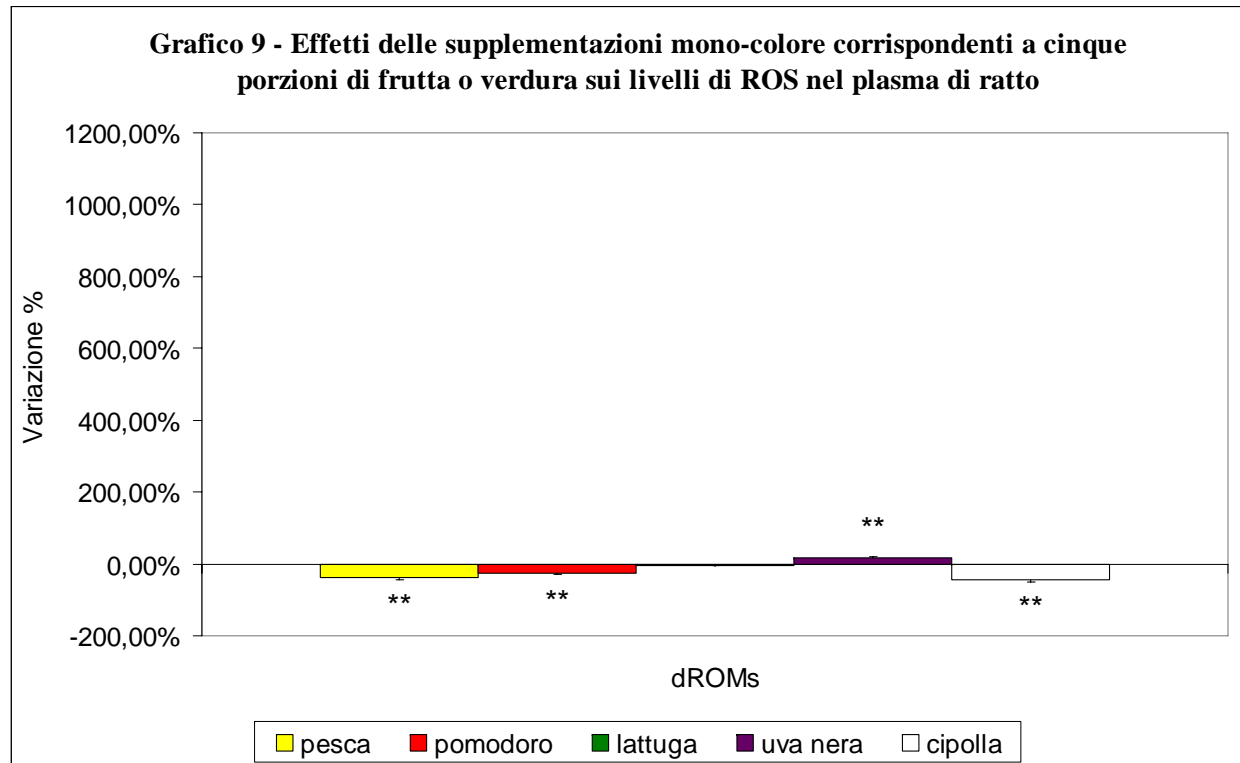
* P < 0.05 e ** P < 0.01 rispetto al controllo, secondo il *rank method* di Wilcoxon.

TABELLA 7.11 – EFFETTI DELLE SUPPLEMENTAZIONI MONO-COLORE CORRISPONDENTI A CINQUE PORZIONI DI FRUTTA O VERDURA SUI LIVELLI DI ROS NEL PLASMA DI RATTO

PARAMETRO	CONTROLLO (VEICOLO)	PESCA	POMORORO	LATTUGA	UVA NERA	CIPOLLA
dROMs (Unità Caratelli)	222.43 ± 10.30	135.29 ± 14.80**	166.71 ± 8.40**	213.86 ± 9.70	261.00 ± 14.10**	122.43 ± 8.70**

I risultati sono la media ± deviazione standard di sei esperimenti indipendenti eseguiti su sei differenti animali.

* P < 0.05 e ** P < 0.01 rispetto al controllo, secondo il *rank method* di Wilcoxon.



* P < 0.05 e ** P < 0.01 rispetto al controllo, secondo il *rank method* di Wilcoxon.

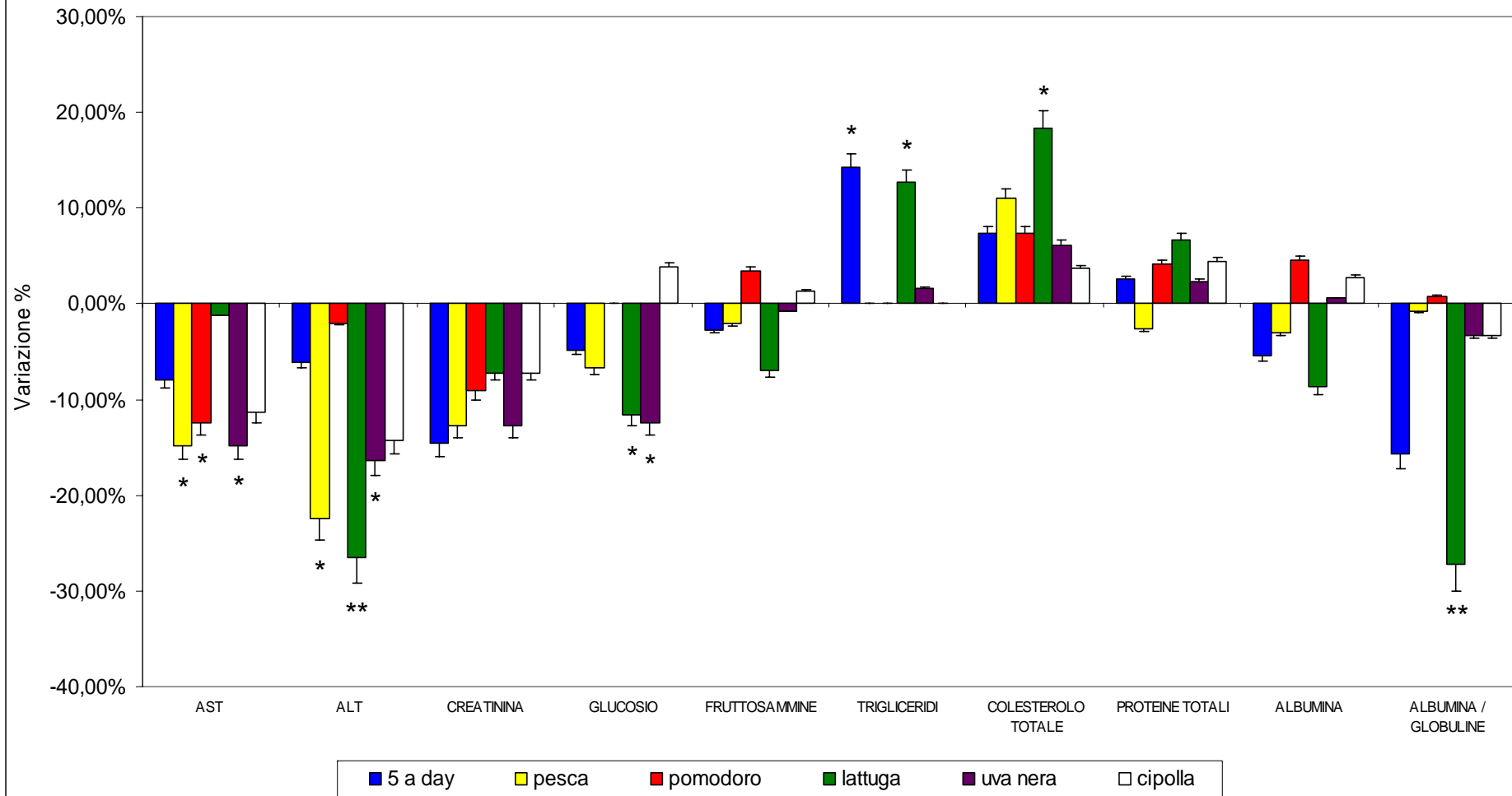
7.12 – EFFETTI DELLE SUPPLEMENTAZIONI MONO-COLORE CORRISPONDENTI AD UNA PORZIONE DI FRUTTA O VERDURA E DI QUELLA EQUIVALENTE AL 5 A DAY SUI PRINCIPALI PARAMETRI EMATOCHIMICI NEL PLASMA DI RATTO

PARAMETRI	INTERVALLI DI RIFERIMENTO	CONTROLLO (VEICOLO)	5 A DAY	PESCA	POMORORO	LATTUGA	UVA NERA	CIPOLLA
AST (U/L)	45.00 – 154.00	88.00 ± 8.00	81.00 ± 8.00	75.00 ± 7.58 *	77.00 ± 7.60 *	87.00 ± 8.10	75.00 ± 7.53 *	78.00 ± 7.63
ALT (U/L)	20.00 – 66.00	49.00 ± 4.31	46.00 ± 4.53	38.00 ± 2.21 *	48.00 ± 3.29	36.00 ± 3.68 **	41.00 ± 3.94 *	42.00 ± 4.26
CREATININA (mg/dl)	0.10 – 5.60	0.55 ± 0.06	0.47 ± 0.03	0.48 ± 0.05	0.50 ± 0.04	0.51 ± 0.04	0.48 ± 0.05	0.51 ± 0.03
GLUCOSIO (mg/dl)	59.44 – 201.76	104.00 ± 9.60	99.00 ± 8.96	97.00 ± 9.90	104.00 ± 10.56	92.00 ± 9.63 *	91.00 ± 8.21 *	108.00 ± 10.26
FRUTTOSAMINE (µmol/L)	-	190.10 ± 18.60	184.80 ± 16.30	186.10 ± 17.60	196.70 ± 18.63	176.80 ± 15.60	188.70 ± 17.83	192.70 ± 17.82
TRIGLICERIDI (mg/dl)	59.44 – 201.76	63.00 ± 6.21	72.00 ± 7.13 *	63.00 ± 5.56	63.00 ± 5.60	71.00 ± 7.12 *	64.00 ± 5.38	63.00 ± 5.96
COLESTEROLO TOTALE (mg/dl)	65.74 – 177.90	82.00 ± 7.60	88.00 ± 8.60	91.00 ± 7.60	88.00 ± 7.62	97.00 ± 8.36 *	87.00 ± 7.60	85.00 ± 7.69
PROTEINE TOTALI (g/dl)	4.70 – 7.90	6.09 ± 0.60	6.25 ± 5.23	5.93 ± 4.93	6.34 ± 6.03	6.50 ± 5.31	6.23 ± 6.21	6.36 ± 5.86
ALBUMINA (g/dl)	2.20 – 5.00	3.34 ± 0.32	3.16 ± 2.98	3.24 ± 3.05	3.49 ± 2.65	3.05 ± 2.64	3.36 ± 3.21	3.43 ± 2.63
ALBUMINE/GLOBULINE	0.40 – 4.00	1.21 ± 0.13	1.02 ± 0.09	1.20 ± 0.11	1.22 ± 0.15	0.88 ± 0.08 **	1.17 ± 0.10	1.17 ± 0.08

I risultati sono la media ± deviazione standard di sei esperimenti indipendenti eseguiti su sei differenti animali.

* P < 0.05 e ** P < 0.01 rispetto al controllo, secondo il *rank method* di Wilcoxon.

Grafico 10 - Effetti delle supplementazioni mono-colore corrispondenti ad una porzione di frutta o verdura e di quella equivalente al 5 a day sui principali parametri ematochimici nel plasma di ratto



* P < 0.05 e ** P < 0.01 rispetto al controllo, secondo il *rank method* di Wilcoxon.

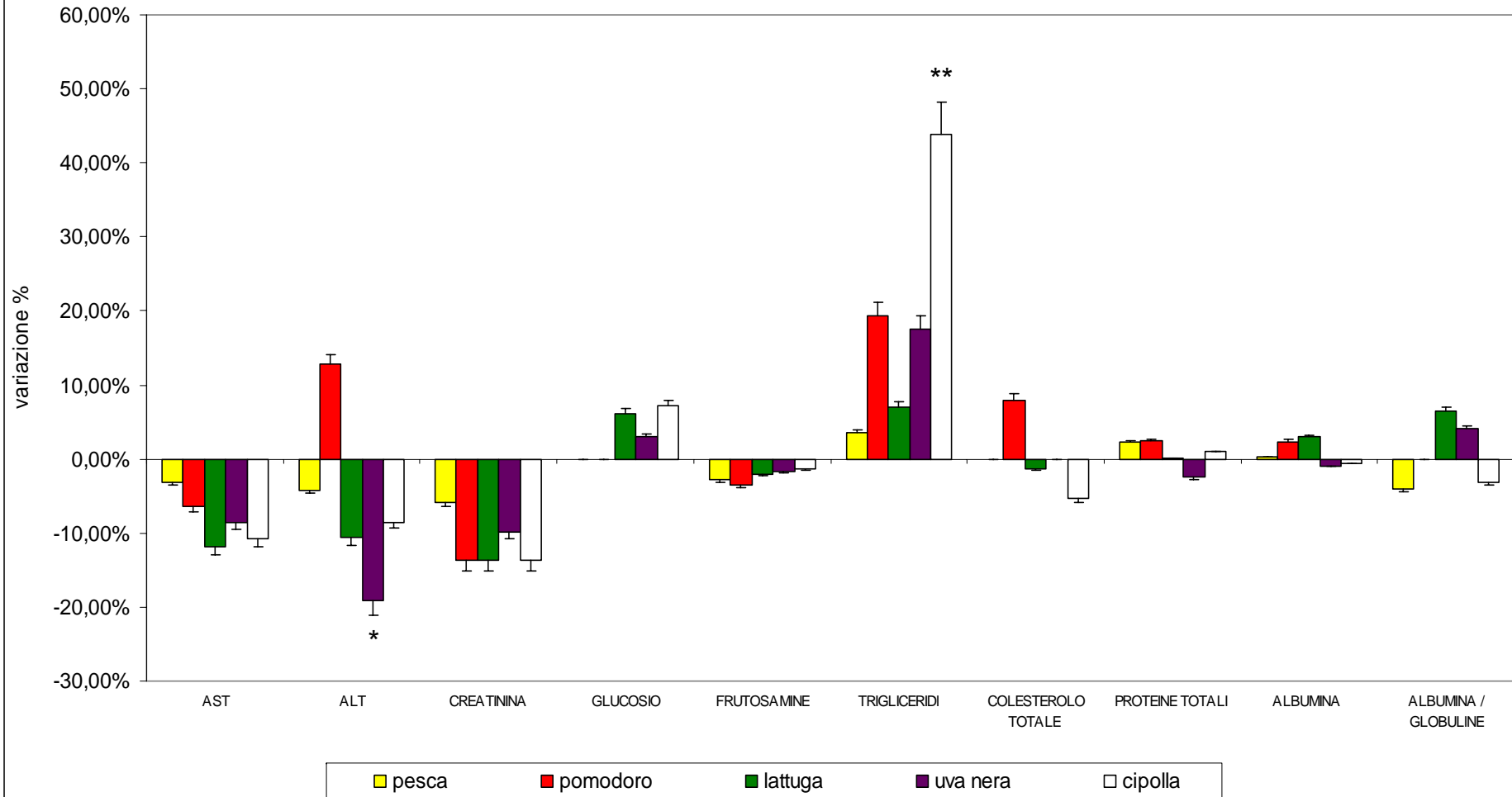
TABELLA 7.13 – EFFETTI DELLE SUPPLEMENTAZIONI MONO-COLORE CORRISPONDENTI A CINQUE PORZIONI DI FRUTTA O VERDURA SUI PRINCIPALI PARAMETRI EMATOCHIMICI NEL PLASMA DI RATTO

PARAMETRI	INTERVALLI DI RIFERIMENTO	CONTROLLO (VEICOLO)	PESCA	POMORORO	LATTUGA	UVA NERA	CIPOLLA
AST (U/L)	45.00 – 154.00	93.00 ± 9.18	90.00 ± 9.30	87.00 ± 8.06	82.00 ± 7.59	85.00 ± 7.96	83.00 ± 8.15
ALT (U/L)	20.00 – 66.00	47.00 ± 3.96	45.00 ± 4.30	53.00 ± 5.03	42.00 ± 3.96	38.00 ± 3.87 *	43.00 ± 4.21
CREATININA (mg/dl)	0.10 – 5.60	0.51 ± 0.04	0.48 ± 0.04	0.44 ± 0.03	0.44 ± 0.3	0.46 ± 0.04	0.44 ± 0.04
GLUCOSIO (mg/dl)	59.44 – 201.76	97.00 ± 9.34	97.00 ± 9.64	97.00 ± 8.96	103.00 ± 10.01	100.00 ± 9.85	104.00 ± 10.32
FRUTTOSAMINE (µmol/L)	-	189.40 ± 17.89	184.10 ± 18.37	182.80 ± 18.62	185.40 ± 17.96	186.10 ± 18.56	186.80 ± 17.99
TRIGLICERIDI (mg/dl)	59.44 – 201.76	57.00 ± 4.65	59.00 ± 6.02	68.00 ± 6.28	61.00 ± 5.96	67.00 ± 6.42	82.00 ± 8.17 **
COLESTEROLO TOTALE (mg/dl)	65.74 – 177.90	75.00 ± 7.25	75.00 ± 7.64	81.00 ± 8.01	74.00 ± 7.21	75.00 ± 7.43	71.00 ± 6.98
PROTEINE TOTALI (g/dl)	4.70 – 7.90	6.07 ± 0.63	6.21 ± 0.61	6.22 ± 0.59	6.08 ± 0.60	5.92 ± 0.60	6.13 ± 0.61
ALBUMINA (g/dl)	2.20 – 5.00	3.36 ± 0.32	3.37 ± 0.31	3.44 ± 0.33	3.46 ± 0.34	3.33 ± 0.30	3.34 ± 0.29
ALBUMINE/GLOBULINE	0.40 – 4.00	1.24 ± 0.11	1.19 ± 0.10	1.24 ± 0.12	1.32 ± 0.12	1.29 ± 0.13	1.20 ± 0.11

I risultati sono la media ± deviazione standard di sei esperimenti indipendenti eseguiti su sei differenti animali.

*** P < 0.05 e ** P < 0.01 rispetto al controllo, secondo il *rank method* di Wilcoxon.**

Grafico 11 - Effetti delle supplementazioni mono-colore corrispondenti a cinque porzioni di frutta o verdura sui principali parametri ematochimici nel plasma di ratto



* P < 0.05 e ** P < 0.01 rispetto al controllo, secondo il rank method di Wilcoxon.

CAPITOLO 8

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Lo studio della potenziale attività chemiopreventiva di una supplementazione secondo il programma alimentare sponsorizzato dall'NIH (*5 a day for a better health*) è stato condotto nel modello animale e confrontato con supplementazioni vegetariane mono-colore a dosi corrispondenti a una oppure cinque porzioni (a base di pomodoro, pesca, lattuga, uva o cipolla) focalizzando l'attenzione su modulazione del metabolismo degli xenobiotici, difese antiossidanti e stress ossidativo. Questi tre fattori, infatti, sono notoriamente legati al processo di cancerogenesi in modo molto stretto. Nel loro complesso, i risultati ottenuti (ed in particolar modo quelli riguardanti il test dROMs e la modulazione degli enzimi di fase I del *drug-metabolism* ed antiossidanti) hanno messo in luce come gli effetti più pronunciati si siano verificati per effetto delle supplementazioni corrispondenti ad una porzione di vegetali. I parametri misurati in seguito alla somministrazione degli equivalenti a cinque porzioni, invece, appaiono del tutto paragonabili ai valori di controllo. Uno scenario di questo tipo potrebbe essere spiegato collocando tali risultati nell'ambito di una curva dose-risposta ormetica (J- o U-shaped) (Calabrese e Baldwin, 2001). Se si considera come *end-point* l'incremento dei ROS nel plasma o l'inattivazione del citocromo P450, il dosaggio minore (singola porzione) si colloca in una posizione più alta lungo l'asse della risposta rispetto alla dose maggiore (cinque porzioni) nel caso di una parabola rovesciata. Tuttavia, la supplementazione *5 a day*, che dovrebbe produrre esiti paragonabili a quelli riscontrati con le diete "cinque porzioni", esula dall'ipotesi avanzata, generando effetti assimilabili alle diete mono-colore corrispondenti a una porzione (fig. 8.1).

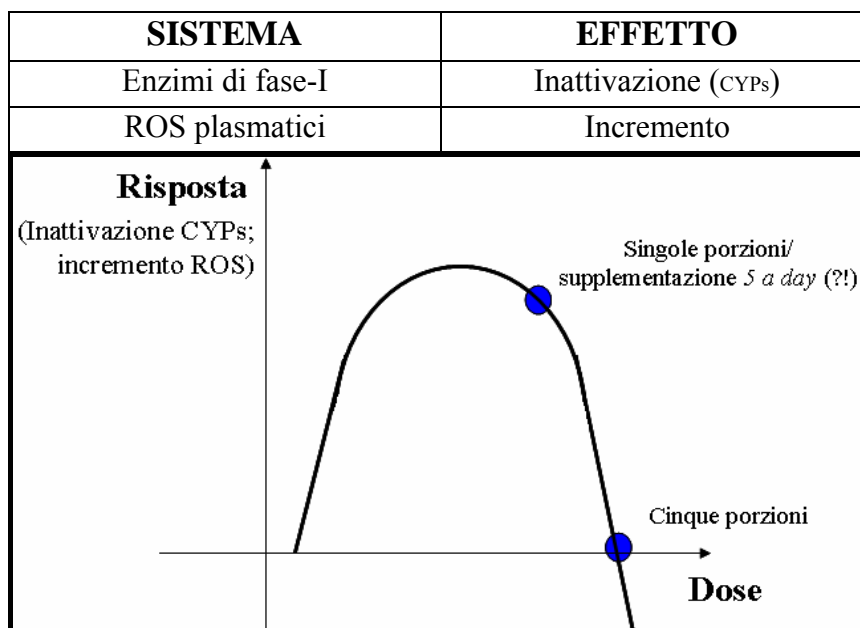


Figura 8.1. In alto sono riassunti gli effetti generati dalle supplementazioni corrispondenti ad una porzione e da quella equivalente al *5 a day* sugli enzimi di fase-I del *drug-metabolism* e sui livelli plasmatici di ROS. In basso è raffigurata la posizione (puramente rappresentativa e ancora da delucidare) delle supplementazioni impiegate lungo un'ipotetica curva dose-risposta ormetica (U- o J-shaped).

E' però ragionevole pensare che le numerosissime interazioni che si possono verificare all'interno di una miscela estremamente complessa di composti chimici, come nel caso della supplementazione *5 a day* che è costituita a sua volta da miscele complesse (vegetali *in toto*), rendano del tutto imprevedibili gli effetti esercitati. Ne vuole essere solo un esempio il comportamento del pesticida vinclozolin che determina sugli enzimi del *drug-metabolism* modulazioni completamente diverse se somministrato da solo (Hrelia e altri, 1996) o come parte di una miscela di fitofarmaci (Canistro e altri, 2008). Le curve dose-risposta a campana sono molto più frequenti di quanto si possa immaginare in tossicologia, se non addirittura prevalenti rispetto ai modelli a soglia (Calabrese e Baldwin, 2003) e si possono verificare nel passaggio da un dosaggio inferiore ad uno superiore (Russo, 2007). I raggi- γ esercitano un comportamento ormetico sullo sviluppo

di adenomi polmonari nel topo, il cadmio sulla vitalità di linee cellulari di cancro ovarico umano e sul cancro testicolare di ratto, la cicloesimide sull'apoptosi di linfociti di topo, il Δ^9 -tetraidrocannabinolo sull'*uptake* delle catecolammine nel corpo striato e nell'ipotalamo di ratto, l'alcol sui livelli sierici di testosterone ed ormone luteinizzante nel ratto, il *transforming growth factor*- β sulla proliferazione di fibroblasti polmonari umani, ecc... (Calabrese e Baldwin, 2001). Nell'ambito dei composti di origine vegetale, inoltre, tale fenomeno non è nuovo. Il consumo di *phytochemicals* attraverso la dieta, infatti, sembra avere un ruolo salutare sull'uomo (Riboli e Norat, 2003), mentre l'assunzione di tali composti sottoforma di supplementazioni estremamente concentrate esercita un effetto tutt'altro che benefico come nel caso del β -carotene (Paolini e altri, 2001; The Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group, 1994; Omenn e altri, 1996), della vitamina C (Podmore e altri, 1998) o E (Miller e altri, 2005). Il resveratrolo, inoltre, sembra essere un'altra molecola con comportamento ormetico: infatti, la natura pro-ossidante dello stilbene a bassi dosaggi è completamente capovolta dall'attività antiossidante a dosi elevate (Russo, 2007). Il falcarinolo (un composto fitochimico delle carote) e l'acido caffeico esercitano un effetto ormetico rispettivamente sulla proliferazione di cellule di carcinoma umano di colon CaCo2 (Young e altri, 2007), dei reni e dello stomaco nel ratto (Lutz e altri, 1997). Infine, le curve dose-risposta a "J" o "U" sembrano essere molto diffuse anche nell'ambito della neuroprotezione esercitata dai *phytochemicals* (Son e altri, 2008). Per quello che riguarda la modulazione degli enzimi del *drug-metabolism* e/o antiossidanti, l'ormesi è già stata messa in evidenza per effetto di una serie di barbiturici o idrocarburi alogenati (Paolini e altri, 1994b e 1994c), nonché per licopene e curcumina. Infatti, in globuli rossi di ratto, basse dosi di licopene inducono l'attività di superossido dismutasi, glutatione reduttasi, catalasi, glutatione perossidasi, mentre elevati dosaggi riportano le attività dei suddetti enzimi a valori di controllo, generando una curva dose-risposta a U

rovesciata. Le medesime considerazioni valgono per l'UDPGT microsomiale e la DT-diaforasi citosolica (Breinholt e altri, 2000). Anche per quello che riguarda la curcumina, la modulazione *in vivo* dell'attività della GST epatica di ratto ha mostrato un andamento bifasico, con addirittura un calo di attività al di sotto dei valori di controllo al dosaggio maggiore di 500 mg/kg (Piper e altri, 1998). Alla luce dei risultati presentati, vi è tuttavia da precisare che il coinvolgimento del fenomeno dell'ormesi nel presente lavoro rimane puramente speculativo. La comparsa di effetti biologici opposti (inattivazione ed induzione metabolica, incremento e decremento dei ROS nel caso di questo studio), tipica dell'ormesi (Calabrese e Baldwin, 2002), dovrà infatti essere confermata dalla misura degli stessi parametri a differenti *endpoints* temporali e/o in seguito alla somministrazione di differenti dosaggi (più alti e/o più bassi di quelli impiegati in questo lavoro). Una curva dose-risposta, infatti, non può essere tracciata con certezza valutando gli effetti generati da due soli dosaggi: quella ormetica, in particolare, richiederebbe l'impiego di almeno sei dosaggi (Calabrese e altri, 1999).

Modulazione degli enzimi del *drug-metabolism*

Per quello che riguarda la modulazione degli enzimi di fase I del *drug-metabolism*, totalmente assente nel caso del dosaggio maggiore, i risultati di questo studio mostrano un marcato effetto di inattivazione metabolica che si verifica quando migliaia di composti fitochimici sono presenti in una dieta molto varia (*5 a day*) e nelle supplementazioni mono-colore corrispondenti ad una porzione di vegetali (soprattutto la lattuga) che, tuttavia, determinano una modulazione negativa di più lieve entità. Tale *trend* è stato confermato dall'analisi *Western Blot* che ha messo in luce una riduzione dei livelli proteici di tutti i CYPs saggiati nel caso della supplementazione *5 a day* e dei CYP1A1/2 e 2E1 per quello che riguarda le mono-diete del colore giallo, verde e viola. Pomodoro e cipolla, invece, non sembrano aver influenzato in questo senso il citocromo P450. L'analisi mediante

RT-PCR, condotta laddove si sono riscontrati i maggiori effetti a livello catalitico e/o proteico (*5 a day* e lattuga), ha evidenziato un probabile effetto trascrizionale esercitato dalla supplementazione *5 a day*, soprattutto sui CYP2B1 e 2E1. Trattandosi di un'analisi puramente qualitativa, questo esito, assente nel caso della lattuga fatta eccezione per il CYP2B1, dovrà tuttavia essere confermato da un'indagine di tipo quantitativo (*real time-PCR*).

Fatta eccezione per il dosaggio di pomodoro corrispondente ad una porzione che induce l'attività dell'UDPGT del 55%, le supplementazioni considerate non hanno significativamente modulato l'attività della fase-II saggiate: non è stata condotta quindi analisi *Western Blot* o RT-PCR.

Tali risultati sarebbero di particolare rilevanza nel contesto della teoria chemiopreventiva classica: la capacità della dieta *5 a day* di determinare la maggiore inattivazione degli enzimi di fase I, sebbene non accompagnata da un'induzione di quelli di fase II, la renderebbe un approccio chemiopreventivo migliore rispetto alle diete monocolori, che pure inattivano il sistema monoossigenasico P450-dipendente anche se in modo più modesto. Vista la natura esclusivamente bioattivante che tale teoria attribuirebbe agli enzimi di fase I, l'attività modulatrice delle supplementazioni saggiate, infatti, proteggerebbe dal danno generato dall'aumento di intermedi elettrofili conseguente alla biotrasformazione di precancerogeni, premutageni e pretossici. Tuttavia, la teoria chemiopreventiva classica, nonostante rappresenti ancora oggi un'auspicata strategia di controllo del cancro, non è affatto in linea con la letteratura degli ultimi decenni (Medline®, Toxline®). Sulla base di quest'ultima, infatti, gli induttori del citocromo P450 sarebbero in grado di diminuire la capacità di alcuni cancerogeni di indurre il cancro *in vivo* in studi di cancerogenesi sperimentale: sembra quindi che l'induzione dei CYPs legati alla detossificazione si verifichi in misura maggiore rispetto a quella delle isoforme che generano metaboliti cancerogeni (Conney, 2003). Inoltre, più in generale, è ormai noto che ciascun enzima del *drug-*

metabolism, sia esso di fase I o II, è caratterizzato da una doppia natura bioattivante/detossificante che non dipende dall'enzima in sé, ma dalla struttura chimica dei substrati con cui l'enzima stesso interagisce. Questo implica che la loro "preventiva" modulazione sia associata ad un'alterazione sia della detossificazione che della bioattivazione di molecole potenzialmente dannose (Paolini, 1998). Le supplementazioni saggiate determinerebbero quindi un esito del tutto incerto e imprevedibile potendo scatenare effetti sia benefici che nocivi, in modo strettamente dipendente da circostanze che non possono essere controllate (Paolini e altri, 2003a). Risulta infatti del tutto improbabile la possibilità di "gestire" le numerosissime esposizioni chimiche a cui gli uomini sono soggetti: la possibilità di esaltare la capacità detossificante e protettiva degli enzimi si potrebbe applicare solo nel caso venisse evitato il contatto con composti dannosi. La situazione è ulteriormente complicata dal fatto che la modulazione chimica o acquisita mediata dalle supplementazioni vegetariane andrebbe ad esacerbare la già complessa "modulazione genetica" condizionata dai polimorfismi che imprime a carico degli enzimi del *drug-metabolism* una "costitutiva" induzione o inibizione. Per esempio, il maggior rischio dei metabolizzatori lenti di sviluppare tossicità da accumulo di warfarin o fenitoina nel caso del CYP2C9, di omeprazolo, benzidiazepine o mefenitoina per quello che riguarda il CYP2C19 o di debrisoquina metabolizzata dal CYP2D6 sarebbe ulteriormente aggravato dalla manipolazione dell'attività enzimatica da parte delle supplementazioni saggiate, soprattutto da quella *5 a day* e della lattuga che esercitano gli effetti di inattivazione maggiori. Bisogna inoltre ricordare il coinvolgimento nel metabolismo endogeno di molte di queste isoforme enzimatiche. I metaboliti generati dagli enzimi a partire da substrati come il colesterolo, gli acidi biliari, gli ormoni steroidei, gli acidi grassi, le prostaglandine e altri eicosanoidi, le vitamine sono coinvolti in numerosissime funzioni come la crescita, il differenziamento, l'apoptosi, l'omeostasi e alcune funzioni neuroendocrine (Nebert, 1994). A tale riguardo quindi, è

facile immaginare che qualunque variazione a scopo chemiopreventivo dell'attività enzimatica di fase I genererebbe inevitabilmente effetti indesiderati. Va infine ricordata l'alterazione della farmacocinetica di eventuali farmaci co-somministrati (Paolini e altri, 1999).

Modulazione degli enzimi antiossidanti e stress ossidativo

Le medesime considerazioni valgono per gli enzimi antiossidanti ed in particolar modo proprio per quelli che hanno maggiormente risentito delle supplementazioni a base di frutta e verdura (ancora una volta soprattutto *5 a day* e lattuga): DT-diaforasi (studiata a livello dell'attività catalitica e tramite RT-PCR) ed eme-ossigenasi (indagata mediante RT-PCR).

La DT-diaforasi è ritenuto un enzima protettivo nei confronti del cancro. Per quanto sia in grado di mantenere antiossidanti cellulari nella loro forma attiva (ridotta) e sia coinvolto nel mantenimento della stabilità di p53 in seguito a stimoli lesivi per il DNA, la DT-diaforasi viene considerato un enzima detossificante principalmente per la capacità di catalizzare la riduzione bi-elettronica obbligata dei chinoni (molecole altamente reattive) a idrochinoni, molecole relativamente meno tossiche che vengono rapidamente coniugate ed escrete. Questo tipo di reazione evita, quindi, la formazione di specie semichinoniche, molecole radicaliche che si formano per opera di reductasi che catalizzano riduzioni mono-elettroniche e che, per via della loro elevata reattività, possono attaccare le componenti nucleofile della cellula o andare incontro a cicli ossido-riduttivi con conseguente formazione di radicali liberi (Nioi e Hayes, 2004). In base a queste considerazioni, quindi, la forte induzione (attività catalitica e mRNA) determinata dalle supplementazioni *5 a day* e della lattuga risulterebbe di particolare rilevanza in termini chemiopreventivi. Tuttavia, analogamente agli enzimi del *drug-metabolism*, anche la doppia natura bioattivante/detossificante della DT-diaforasi è nota ormai da tempo (De Flora e altri, 1988). Infatti, in modo dipendente unicamente

dalla struttura chimica del composto con cui interagisce, è in grado di produrre non solo molecole idrochinoniche stabili, ma anche labili dal punto di vista ossido-riduttivo (Cadenas, 1995). Fra queste ultime vi è il metabolita idrochinonico della vitamina K, *phytochemical* particolarmente abbondante nella lattuga (Bolton-Smith e altri, 2000). E' stato infatti dimostrato, in cellule di carcinoma mammario umano, come la forma idrochinonica della vitamina K generata dalla DT-diaforasi sia in grado di determinare un aumento dei livelli del radicale HO• e rotture a singolo e/o doppio filamento del DNA, eventi fortemente ridotti dall'impiego del dicumarolo (noto inibitore della DT-diaforasi). Alla base di tali risultati è stato supposto un meccanismo ossido-riduttivo che, a partire dalla forma idrochinonica della vitamina K, porterebbe alla formazione prima di O₂^{•-} e successivamente, attraverso la reazione di Fenton, di HO• (fig. 8.2 A) (Nutter e altri, 1992). E' ragionevole pensare quindi che la vitamina K contenuta nella supplementazione a base di lattuga, in virtù della sua natura chinonica (Nioi e Hayes, 2004), abbia indotto la DT-diaforasi, come dimostrano l'aumento dell'attività catalitica e del mRNA (RT-PCR). L'idrochinone della vitamina K generatosi di conseguenza, instabile dal punto di vista ossido-riduttivo, può aver causato un aumento dei ROS. Tale ipotesi si concilia con l'aumento dello stress ossidativo riscontrato con il dROMs test nel plasma dei ratti supplementari con lattuga. Si può ipotizzare che a tale situazione di stress abbia contribuito anche il fatto che la riduzione bi-elettronica della vitamina K ad opera della DT-diaforasi sia in competizione con quelle mono-elettroniche catalizzate da enzimi fra i quali la NADPH-citocromo (P450)-c-reduttasi che, come anticipato precedentemente, generano semichinoni altamente instabili dal punto di vista ossido-riduttivo (fig. 8.2 B) (Joseph e Jaiswal, 1994). Il paragonabile profilo di induzione della DT-diaforasi e il simile aumento del livello di stress ossidativo (dROMs test) riscontrati anche per la supplementazione 5 *a day* fanno ipotizzare un probabile ruolo preponderante della lattuga nel *mix* dei cinque vegetali.

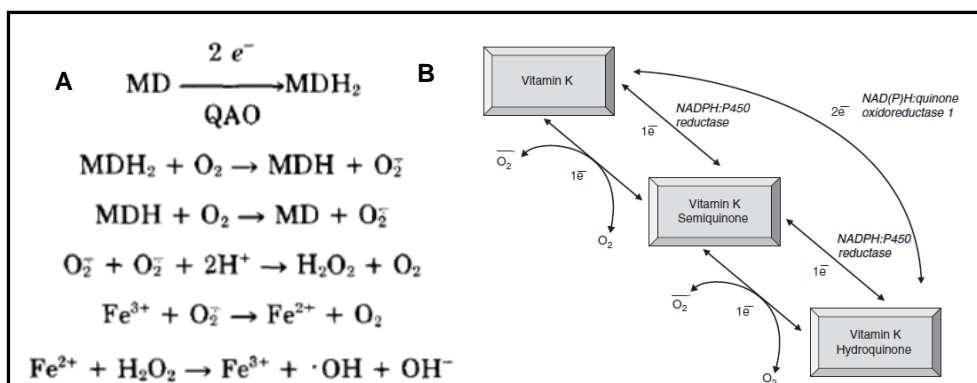


Figura 8.2. Generazione di ROS da parte della vitamina K e della sua forma idrochinonica.

La stessa analisi vale per l'eme ossigenasi. Nel presente studio la sua induzione è stata saggiata dal punto di vista trascrizionale (RT-PCR) nel fegato degli animali trattati con le supplementazioni *5 a day* e a base di lattuga. Tale evento, tuttavia, è notoriamente associato all'aumento della sua attività catalitica (Bauer e altri, 1998; Sonin e altri, 1999). L'induzione di questo enzima viene considerata solitamente un evento benefico principalmente per il ruolo svolto dall'eme ossigenasi nel catabolismo del gruppo eme. Quest'ultimo, quando non complessato alle proteine, è infatti una molecola estremamente tossica poiché in grado di scatenare stress ossidativo, infiammazione ed emolisi (Kumar e Bandyopadhyay, 2005). Inoltre, la reazione di degradazione dell'eme catalizzata dal suddetto enzima rilascia quantità equimolari di biliverdina (pigmento antiossidante e citoprotettivo), monossido di carbonio (che, oltre ad essere coinvolto nel rilassamento del tono muscolare, agisce come antinfiammatorio e vasodilatatore) e Fe^{2+} (che stimola la sintesi di ferritina che, chelando il ferro, agisce come antiossidante e citoprotettore) (Bauer e Bauer, 2002). Tuttavia, è proprio il rilascio di quest'ultimo componente a conferire all'eme ossigenasi una natura pro-ossidante. Il rilascio di Fe^{2+} , infatti, sensibilizza allo stress ossidativo (piuttosto che proteggere): ciò si verifica non solo ad elevati livelli di espressione e/o

attività enzimatica (Suttner DM, Dennery, 1999; Kvam e altri, 2000), ma anche entro un *range* di induzione piuttosto ristretto (Dennery e altri, 1997). Come per la DT-diaforasi, quindi, anche l'induzione dell'eme ossigenasi in seguito alla somministrazione delle diete *5 a day* e della lattuga può essere correlata positivamente all'elevata presenza di ROS riscontrata mediante il dROMs test nel plasma dei ratti che hanno ricevuto le medesime supplementazioni. Inoltre, l'induzione dell'eme ossigenasi si concilia anche con la marcata inattivazione del citocromo P450, che, come emoproteina, risente fortemente dell'aumento del catabolismo del suo gruppo prostetico (Guerre e altri, 1996; Kobayashi e altri, 2000; Botros e altri, 2002). Rimane tuttavia da chiarire quale sia stato l'evento che ha scatenato l'induzione di tale enzima, tema che verrà ripreso più avanti nella discussione.

Sulla base delle considerazioni riguardanti gli enzimi antiossidanti succitati non deve quindi stupire la presenza di ROS in un contesto di inattivazione del sistema monoossigenasico P450-dipendente. Il rilascio di ROS durante il ciclo catalitico di quest'ultimo farebbe infatti presupporre una diminuzione dello stress ossidativo in seguito alla sua inattivazione. Recentemente, tuttavia, è stato dimostrato come la presenza di stress ossidativo (misurato a livello tissutale e/o sistemico) sottenda, i meccanismi più svariati quali, ad esempio, la deplezione dei nucleotidi piridinici e non esclusivamente l'induzione dei CYPs (riscontrata a livello microsomiale), e possa quindi essere sostanzialmente svincolata dall'attività questi ultimi (Dostalek, 2007 e 2008).

Nei trattamenti per i quali non è stata misurata la modulazione dell'eme ossigenasi e/o non hanno determinato una significativa induzione della DT-diaforasi (pesca, pomodoro, uva, cipolla), la presenza di stress ossidativo riscontrata mediante il dROMs test potrebbe essere spiegata considerando ipotesi alternative. Recentemente, Nyby e altri (2007) hanno registrato un aumento dei

livelli plasmatici di H₂O₂ in ratti supplementari con fruttosio. Questo zucchero naturale sembra essere coinvolto nell'insorgenza della sindrome metabolica attraverso numerosi meccanismi. Tra questi vi è l'aumento dei livelli plasmatici di acido urico. Quest'ultimo, insieme ai prodotti finali di glicazione avanzata (la cui presenza, tuttavia, sarebbe stata suggerita da un'alterazione dei livelli di fruttosammine), induce stress ossidativo ed infiammazione (Miller e Adeli, 2008), probabilmente attraverso un meccanismo (indiretto) di attivazione della NADPH ossidasi (Sautin e altri, 2007).

Un'altra possibilità riguarderebbe invece la natura pro-ossidante degli antiossidanti. Nonostante ciascuna specie e/o varietà differisca per capacità di assorbimento, accumulo e tolleranza (Turner, 1994), molti riferimenti in letteratura riportano la capacità delle colture di immagazzinare metalli all'interno loro tessuti (Sauerbeck 1991; Muller e Anke, 1994; Hooda, 1997; Bahemuka e Mubofu, 1999; Cobb e altri, 2000; Mattina e altri, 2003; Hough e altri, 2004; Zhou e altri, 2005b), soprattutto cadmio e zinco che sono facilmente mobilizzati dal terreno (Mench e altri, 1994). Fra queste, la lattuga (e più in generale le verdure a foglia) è particolarmente abile in tale accumulo, sia per via di peculiari aspetti metabolici, sia come conseguenza dell'estensione della superficie disponibile per scambi con l'ambiente esterno (Ross e Kate, 1994; Peris e altri, 2007). Inoltre, come prova di un possibile assorbimento, in un esperimento *in vitro* volto a riprodurre il processo digestivo, lo stesso vegetale ha anche mostrato un'eccezionale capacità di rilascio dei metalli assimilati, soprattutto manganese e zinco (Intawongse e Dean, 2006). Tali considerazioni sono di particolare rilevanza considerando che molti antiossidanti naturali diventano pro-ossidanti in presenza di metalli attivi dal punto di vista ossido-riduttivo (Valko e altri, 2006). Ne è un esempio la vitamina C (Winterbourn 1981; Halliwell, 1996; Smith e altri, 1997; Kang e altri, 1998) che, tuttavia, può mostrare tale natura anche in assenza di metalli (Lee e altri. 2001). Anche l'aumento dei livelli di basi modificate del DNA riscontrata in linfociti umani è stato

attribuito da Podmore e altri (1998) alla natura pro-ossidante e mutagenica della vitamina C (500mg/giorno). Anche i polifenoli sembrano risentire della presenza di metalli: in seguito all'interazione con questi ultimi generano, infatti, aumento di ROS, presumibilmente attraverso un meccanismo di auto-ossidazione che porta alla formazione di radicali semichinonici (Long e altri, 2000; Oikawa e altri, 2003; Kobayashi e altri, 2004; Lee e altri, 2005).

La presenza di metalli non è l'unica condizione in relazione alla quale si può manifestare la natura pro-ossidante dei *phytochemicals*. Anche il pH, la concentrazione (dei *phytochemicals* stessi) o la pressione parziale di ossigeno possono contribuire (Valko e altri, 2006). I carotenoidi, ad esempio, (in particolare il β -carotene) perdono la loro natura antiossidante, o addirittura diventano pro-ossidanti, ad elevate concentrazioni o pressioni parziali di ossigeno (Rice-Evans e altri, 1997). Lo stesso vale anche per i polifenoli che manifestano carattere pro-ossidante ad elevate concentrazioni o pH (Valko e altri, 2006).

Resta da stabilire se lo stress ossidativo sia stato la causa o una conseguenza delle alterazioni metaboliche riscontrate. A tale proposito sono state avanzate due possibilità che non vogliono essere una spiegazione, ma solo ipotesi di interpretazione dei risultati ottenuti.

Al centro della prima ipotesi vi sarebbe lo stress ossidativo come causa scatenante delle alterazioni delle attività catalitiche saggiate e dei relativi processi trascrizionali e tradizionali (fig. 8.3). Tale condizione si sarebbe instaurata a causa della natura pro-ossidante dei *phytochemicals* alla quale avrebbe contribuito la loro elevata concentrazione e/o il rilascio dei metalli accumulati nei tessuti dei vegetali somministrati. Come conseguenza, i CYP e gli enzimi antiossidanti maggiormente sensibili alla presenza di ROS come eme ossigenasi e DT-diaforasi sarebbero stati rispettivamente inattivati e indotti. Lo stress ossidativo infatti è noto per avere un effetto distruttivo sul citocromo P450: stimoli come l' NO^\bullet , H_2O_2 e altre specie radicaliche centrate sull'ossigeno e i raggi UVA sono infatti in

grado di determinare un aumento del P420 (forma denaturata del P450) ed un conseguente rilascio del gruppo prostetico eme (Kim e altri, 1995; Kvam e altri, 1999).

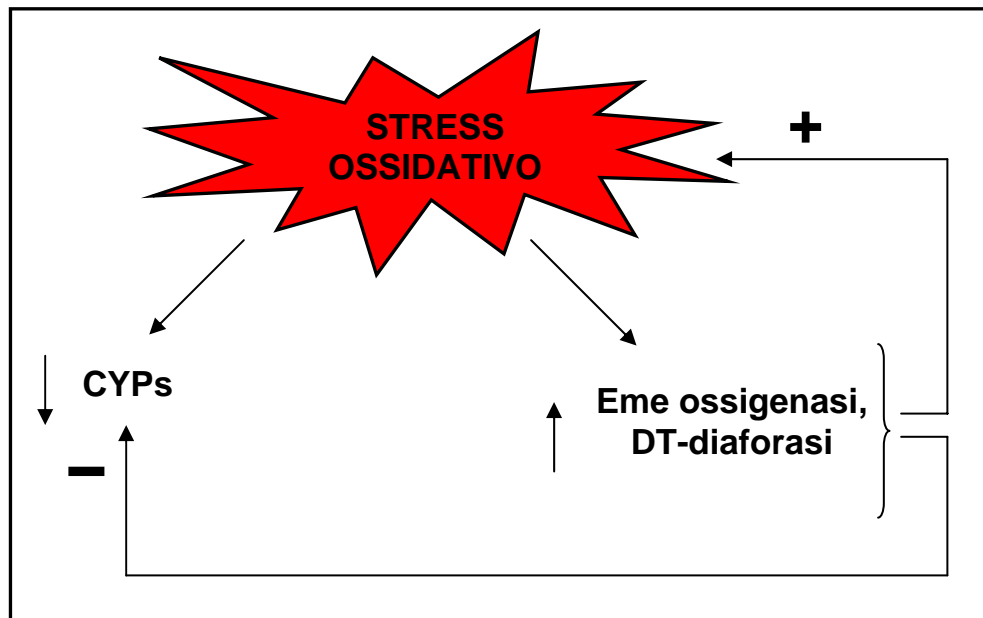


Figura 8.3. Ipotesi 1: lo stress ossidativo è causa degli eventi registrati.

I livelli di stress ossidativo raggiunti in seguito alla somministrazione di alcuni alimenti (lattuga - molto ricca di metalli - e conseguentemente la supplementazione *5 a day*) avrebbero, invece, stimolato gli enzimi antiossidanti maggiormente sensibili alla presenza di ROS: eme ossigenasi e DT-diaforasi. L'effetto dei radicali liberi su questi ultimi due enzimi è infatti di tipo induttivo e si manifesta presumibilmente attraverso il sensore *redox* NRF2 (Surh, 2003). Tuttavia, per i motivi descritti precedentemente, tali induzioni non avrebbero fatto altro che alimentare ulteriormente l'aumento dello stress ossidativo e l'inattivazione del sistema monoossigenasico P450-dipendente. Tale modello quindi si concilia bene con i risultati ottenuti per effetto dalle supplementazioni a base di lattuga e *5 a day*. Tuttavia, mentre risulta chiaro l'effetto trascrizionale di entrambe le supplementazioni sugli enzimi antiossidanti, diversa sarebbe la

questione per i CYPs. Il meccanismo proposto, infatti, come dimostrato dal *Western Blot*, avrebbe interessato tutti i CYPs saggiati (con addirittura un probabile meccanismo trascrizionale) nel caso della supplementazione *5 a day*. Gli effetti sul mRNA invece mancherebbero nel caso della dieta del colore verde, fatta eccezione per il CYP2B1. Questo non deve stupire in quanto diverse sostanze/molecole possono modulare l'attività enzimatica attraverso meccanismi differenti (trascrizionali, post-trascrizionali e/o post-traduzionali). Laddove la mancata induzione degli enzimi eme ossigenasi e DT-diaforasi non abbia contribuito ad incrementare ulteriormente il livello di ROS, si può ipotizzare che il comportamento pro-ossidante dei *phytochemicals* abbia generato un livello di stress ossidativo tale da determinare solo effetti limitati sul citocromo, interessando sia i livelli proteici di alcuni CYP che l'attività catalitica del sistema monoossigenasico nel caso di pesca e uva e solo l'attività catalitica nel caso di pomodoro e pesca.

Una seconda ipotesi, invece, pone lo stress ossidativo come una conseguenza dell'intenso metabolismo dei *phytochemicals* ad opera degli enzimi antiossidanti e del *drug-metabolism* (fig. 8.4).

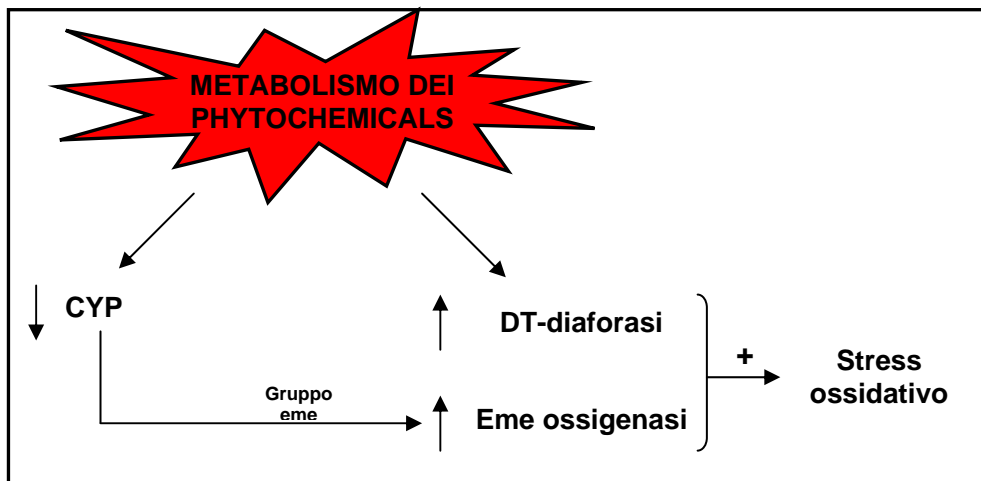


Figura 8.4. Ipotesi 2: l'intenso metabolismo di *phytochemicals* è causa degli eventi registrati, lo stress ossidativo una conseguenza.

La capacità del citocromo P450 di riconoscere un'ampia varietà di substrati lo espone di frequente a fenomeni di inattivazione (Murray, 1997). Fra i *phytochemicals*, inoltre, non è inusuale la capacità di inibirlo in modo suicida, fenomeno al quale può fare seguito il rilascio del gruppo prostetico eme. Ne sono un esempio alcuni composti contenenti zolfo presenti nei vegetali del genere *Allium*, isotiocianati e furanocumarine come il bergamottino (Hollenberg, 2008). E' possibile quindi che l'intenso carico di composti fitochimici somministrati con le supplementazioni a base di frutta e verdura abbia determinato sul citocromo un effetto di questo tipo. Il (pro-ossidante) gruppo eme così rilasciato avrebbe indotto l'eme-ossigenasi (Kobayashi e altri, 2000), determinando una ulteriore *down-regulation* del citocromo P450 che, come spiegato precedentemente, risente fortemente del catabolismo del suo gruppo prostetico. La conseguente liberazione di ferro e la sua successiva interazione con l'ossigeno e/o i composti fitochimici rappresenterebbe quindi l'evento che ha scatenato lo stress ossidativo, condizione alla quale avrebbero contribuito anche i metalli contenuti nei vegetali somministrati. Nel caso della supplementazione a base di lattuga e conseguentemente di quella *5 a day* tale condizione di stress risulterebbe ulteriormente esacerbata anche per via del metabolismo della vitamina K da parte della DT-diaforasi e della conseguente formazione di semichinoni e/o idrochinoni instabili, come spiegato precedentemente.

Non è da escludere che non solo la prima o la seconda ipotesi sopra descritte, ma una combinazione delle due abbia determinato gli esiti riscontrati.

In base alle considerazioni fatte si può quindi affermare che qualunque manipolazione metabolica, sia a carico degli enzimi del *drug-metabolism* sia di quelli antiossidanti, possa aumentare il rischio tossicologico e debba quindi essere seriamente riconsiderata come strategia chemiopreventiva (Paolini e altri, 2003b). Lo stress ossidativo riscontrato a livello plasmatico, inoltre, non si inquadra

minimamente in un contesto protettivo: è infatti ormai risaputo quanto i ROS siano intimamente connessi a tutte le fasi della cancerogenesi chimica (Valko e altri, 2006). Sembra quindi che l'impiego di singole varietà di vegetali, da sole o in combinazione - come nella supplementazione *5 a day* - e, più in generale, anche l'adozione degli stili alimentari da sempre considerati i più salutari, come quello vegetariano/vegano, siano da ritenersi non poco azzardate in termini chemiopreventivi.

Non è senza significato il fatto che la letteratura più recente stia fortemente ridimensionando l'esistenza di un'associazione inversa tra il consumo di frutta e verdura ed il rischio di cancro che, solo fino a pochi anni fa, veniva tanto acclamata, discrepanza probabilmente dovuta alle differenti metodologie impiegate (deboli studi retrospettivi caso-controllo del passato *versus* il più attuale *record* delle abitudini alimentari dei volontari per numerosi anni) e ad una maggiore consapevolezza della difficoltà di una raccolta di dati oggettivi (Vastag, 2005). Sta emergendo quindi sempre più chiaramente non solo l'infondatezza ma, in alcuni casi, una ritrattazione della semplice equazione:

vegetale = salutare

In tal senso esempi emblematici sono rappresentati dal consumo selettivo di antiossidanti (da soli o in combinazione) come il β -carotene, la vitamina A, C, E (Bjelakovic e altri, 2004), di singole varietà di *Cruciferae* come broccoli, cavoli o cavoletti di Bruxelles o, addirittura, di una dieta vegetariana (Lampe e altri, 2000). Infatti, se da un lato, sembra ormai riconosciuto il ruolo protettivo di quest'ultima nei confronti delle patologie cardio-vascolari, dall'altro i dati sulla mortalità ed il cancro sembrano piuttosto inconsistenti, se non addirittura allarmanti (Fraser, 2009). Molto recentemente, infatti, uno studio prospettico condotto in Gran Bretagna su 63.550 uomini e donne ha messo in evidenza un aumento dell'incidenza del cancro all'intestino colon-retto nei vegetariani (Key e altri, 2009), evento

spiegabile dall'aumento della frequenza dei movimenti intestinali che questo tipo di alimentazione causa (Sanjoaquin e altri, 2004).

E' quindi poco verosimile che una singola tipologia di frutta e verdura o un'alimentazione selettiva come quella vegetariana/vegana possano apportare (esclusivamente) benefici e che sia sufficiente riversare la speranza di sconfiggere il cancro unicamente in programmi alimentari come il *5 a day for a better health* che, infatti, sta iniziando ad enfatizzare il ruolo protettivo dei vegetali nei confronti delle malattie cardio-vascolari anziché del cancro (Vastag, 2005). Piuttosto, a tale scopo, sembra più indicato un *mix* equilibrato di micro-, macro-nutrienti, composti fitochimici, fibre, proteine, carboidrati e grassi apportato da una dieta completa che contempli il consumo (abbondante) di vegetali ma anche di (limitate, ma non assenti) quantità di carne (Kapiszewska, 2006; Ginter, 2008). Il programma alimentare *5 a day for a better health* sponsorizzato dall'NIH non dovrebbe quindi essere ricondotto all'adozione di un regime alimentare selettivo, ma piuttosto inquadrato nell'ambito di un'alimentazione completa. A tale riguardo, la dieta Mediterranea viene proposta dai nutrizionisti e dalla letteratura scientifica come modello. I principi cardine su cui poggia - *varietà nella scelta degli alimenti e stile di vita corretto* (moderata ma costante attività fisica, limitato consumo di alcol, eliminazione dell'abitudine al fumo di sigaretta, ecc...) sembrano un vero e proprio *elisir* di buona salute. Una recente meta-analisi, infatti, ha suggerito che l'aderenza alla dieta Mediterranea sarebbe associata ad una riduzione del 9% della mortalità sia per tutte le cause che per patologie cardiovascolari, una diminuzione del 6% dell'incidenza e della mortalità da cancro ed un calo del 13% dell'incidenza di patologie neurodegenerative come il morbo di Parkinson e Alzheimer (Sofi e altri, 2008).

BIBLIOGRAFIA

(Per una versione più dettagliata della bibliografia consultare il CD allegato)

1. Abdel-Wahab MH e altri. *Pharmacol Res* 2003; 48: 461-465.
2. Aebi H. *Methods Enzymol* 1984; 105: 121-126.
3. Afaq F e altri. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003; 186: 28-237.
4. Aggarwal BB, Shishodia S. *Biochem Pharmacol* 2006; 71: 1397-1421.
5. Ahmad A e altri. *Cancer Lett* 2000; 154: 29-37.
6. Ahmad N e altri. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 1466-1473.
7. Aitio A. *Anal Biochem* 1978; 85: 488-491.
8. Ale-Agha N e altri. *Biochem Pharmacol* 2002; 63: 2145-2149.
9. Ali M e altri. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2000; 62: 55-73.
10. Alonso Borbalán AM e altri. *J Chromatogr A* 2003; 1012: 31-38.
11. American Cancer Society. *Cancer facts and figures* 1992. Atlanta: ACS 1992; 5: 26.
12. American Heart Association. *Heart and stroke facts* 1992. Dallas: AHA 1992; 8: 13.
13. Ames BN e altri. *PNAS USA* 1995; 92: 5258-5265.

14. Amir H e altri. *Nutr Cancer* 1999; 33: 105-112.
15. Arditti FD e altri. *Mol Cancer Ther* 2005; 4: 325-331.
16. Arnault I, Auger J. *J Chromatogr A* 2006; 1112: 23-30.
17. Asano N e altri. *Glycobiology* 1997; 7: 1085-1088.
18. Astorg P e altri. *Nutr Cancer* 1997; 29: 60-68.
19. Baer-Dubowska W e altri. *Xenobiotica* 1998; 28: 735-743.
20. Bagchi D e altri. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1997; 95:179-189.
21. Bahemuka TE, Mubofu EB. *Food Chemistry* 1999; 66: 63-66.
22. Barstad B e altri. *Eur J Cancer Prev* 2005; 14: 239-243.
23. Basu A, Imrhan V. *Eur J Clin Nutr* 2007; 61: 295-303.
24. Bauer I e altri. *Hepatology* 1998; 27: 829-838.
25. Bauer M, Bauer I. *Antioxid Redox Signal* 2002; 4: 749-758.
26. Baur JA e altri. *Nature* 2006; 444: 337-342.
27. Baur JA, Sinclair DA. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5: 493-506.
28. Bedard K, Krause KH. *Physiol Rev* 2007; 87: 245-313.
29. Ben-Dor A e altri. *Mol Cancer Ther* 2005; 4: 177-186.

30. Benetou V e altri. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17: 387-392.
31. Bentinger M e altri. *Mitochondrion* 2007; Suppl 7: S41-50.
32. Berenblum I. *J Path Bacteriol* 1929; 32: 425-434.
33. Berger SJ e altri. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 288: 101-105.
34. Bhuvanewari V, Nagini S. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2005; 5: 627-635.
35. Bhuvanewari V e altri. *Fitoterapia* 2001; 72 : 865-874.
36. Bhuvanewari V e altri. *J Biochem Mol Biol Biophys* 2002; 6: 257-260.
37. Bhuvanewari V e altri. *J Exp Clin Cancer Res* 2004; 23: 241-249.
38. Biaglow JE, Miller RA. *Cancer Biol Ther* 2005; 4: 6-13.
39. Bianchini F, Vainio H. *Environ Health Perspect* 2001; 109: 893-902.
40. Bjelakovic G e altri. *Lancet* 2004; 364: 1219-1228.
41. Block G e altri. *Nutr Cancer* 1992; 18: 1-29.
42. Boileau TW e altri. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 1578-1586.

43. Bolton-Smith C e altri. *Br J Nutr* 2000; 83: 389-399.
44. Bomser JA e altri. *Cancer Lett* 1999; 135: 151-157.
45. Boocock DJ e altri. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16: 1246-1252.
46. Borrelli F e altri. *Fitoterapia* 2002; 73: S38-S43.
47. Bose KS, Agrawal BK. *West Indian Med J* 2006; 55: 274-278.
48. Bose KS, Agrawal BK. *Ann Nutr Metab* 2007; 51: 477-481.
49. Botros FT e altri. *Hypertension* 2002; 39: 639-644.
50. Bove K e altri. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 291: 1001–1005.
51. Bowen P e altri. *Exp Biol Med (Maywood)* 2002; 227: 886-893.
52. Box G, Hunter W. New York: Willey 1978: 80-82.
53. Boyce A e altri. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004; 802: 217-223.
54. Breinholt V e altri *Cancer Lett* 2000; 154: 201-210.
55. Briggs NC e altri. *Am J Epidemiol* 2002; 156: 454-462.
56. Brooker S e altri. *Radiother Oncol* 2006; 79: 45-51.
57. Brown L e altri. *Am J Clin Nutr* 1999; 70: 517-524.

58. Bruce M. *Methods Enzymol* 1967; 10: 551–553.
59. Burke MD e altri. *Biochem Pharmacol* 1985; 34: 3337-3345.
60. Cadenas E. *Biochem Pharmacol* 1995; 49: 127-140.
61. Calabrese EJ e altri. *Risk Anal* 1999; 19: 261-281.
62. Calabrese EJ, Baldwin LA. *Trends Pharmacol Sci* 2001; 22: 285-291.
63. Calabrese EJ, Baldwin LA. *Hum Exp Toxicol* 2002; 21: 91-97.
64. Calabrese EJ, Baldwin LA. *Toxicol Sci* 2003; 71: 246-250.
65. Canene-Adams K e altri. *J Nutr* 2005; 135: 1226-1230.
66. Canistro D e altri. *Food Chem Toxicol* 2008; 46: 34-42.
67. Canistro D e altri. *Food Chem Toxicol* 2009; 47: 454-461.
68. Cantos E e altri. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 5691-5696.
69. Cao Z, Li Y. *Eur J Pharmacol* 2004; 489: 39–48.
70. Carbone M, Pass HI. *Sem Cancer Biol* 2004; 14: 399-405.
71. Carratù B, Sanzini E. *Ann Ist Super Sanità* 2005; 41: 7-16.
72. Casper RF e altri. *Mol Pharmacol* 1999; 56: 784–790.
73. Castelluccio C e altri. *Biochem J* 1996; 316: 691-694.

74. Catania VA e altri. *Ann Hepatol* 2004; 3: 11-17.
75. Cauchi S e altri. *Carcinogenesis* 2001; 22: 1819-1824.
76. Chan WS e altri. *Anticancer Res* 1995; 15: 703-707.
77. Chan WK, Delucchi AB. *Life Sci* 2000; 67: 3103-3112.
78. Chan JM e altri. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 2093-2097.
79. Chandra Mohan KV e altri. *J Med Food* 2003; 6: 169-173.
80. Chang TK e altri. *Can J Physiol Pharmacol* 2000; 78: 874-881.
81. Chang TK e altri. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 299: 874-882.
82. Chao C. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16: 2436-2447.
83. Chao C e altri. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17: 2692-2699.
84. Chen DL, Huang TB. *Cancer Lett* 1997; 117: 17-22.
85. Chen L e altri. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 1872-1879.
86. Chen C e altri (a). *Free Radic Biol Med* 2004; 37: 1578-1590.
87. Chen ZH e altri (b). *Carcinogenesis* 2004; 25: 2005-2013.
88. Chen CY e altri. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 331: 993-1000.

89. Chiang LC e altri. *Planta Med* 2003; 69: 600-604.
90. Cho DI e altri. *Life Sci* 2002; 71: 2071-2082.
91. Chu Q e altri. *BJU Int* 2007; 99: 925-932.
92. Chun OK e altri. *J Agric Food Chem* 2003; 51: 8067-8072.
93. Ciolino HP e altri. *Cancer Res* 1998; 58: 5707-5712.
94. Ciolino HP, Yeh GC. *Mol Pharmacol* 1999; 56: 760-767.
95. Cobb GP e altri. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2000; 19: 600-607.
96. Cohen LA e altri. *Nutr Cancer* 1999; 34: 153-159.
97. Conney AH. *Cancer Res* 2003; 63: 7005-7031.
98. Costa LG e altri. *G Ital Med Lav Erg* 2003; 25: 320-327.
99. Creasy LL, Coffee M. *J Am Soc Hortic Sci* 1988; 113: 230-234.
100. Crozier A e altri. *J Agric Food Chem* 1997; 45: 590-595.
101. D'Archivio M e altri. *Ann Ist Super Sanità* 2007; 43: 348-361.
102. Dahan K e altri. *J Soc Integr Oncol* 2008; 6: 29-36.
103. Dale DC e altri. *Blood* 2008; 112: 935-945.
104. Danielson PB. *Curr Drug Metab* 2002; 3: 561-597.

105. Das PM, Singal R. *J Clin Oncol* 2004; 22: 4632-4642.
106. De Flora S e altri. *Carcinogenesis* 1988; 9: 611-617.
107. De Flora S e altri. *Mutat Res* 2001; 480-481: 9-22.
108. De Flora S, Ferguson LR. *Mutat Res* 2005; 591: 8-15.
109. de la Lastra CA, Villegas I. *Biochem Soc Trans* 2007; 35: 1156-1160.
110. de Lorimier AA. *Am J Surg* 2000; 180: 357-361.
111. Dean M e altri. *Genome Res* 2001; 11: 1156-66.
112. Degtyarenko KN. *Prot Eng* 1995; 8: 737-747.
113. Dennery P e altri. *J Biol Chem* 1997; 272: 14937-14942.
114. Devi A e altri. *Med Sci Monit* 2006; 12: BR124-129.
115. Di Mascio P e altri. *Arch Biochem Biophys* 1989; 274: 532-538.
116. Dinkova-Kostova AT e altri *PNAS* 2002; 99: 11908-11913.
117. Do MH e altri. *Int J Vitam Nutr Res* 2007; 77: 130-141.
118. Doll R, Peto R. *J Natl Cancer Inst* 1981; 66: 1191-1308.
119. Dostalek M e altri. *Mol Pharmacol* 2007; 72: 1419-1424.

120. Dostalek M e altri. *J Biol Chem* 2008; 283: 17147-17157.
121. Druesne N e altri. *Carcinogenesis* 2004; 25: 1227-1236.
122. Du Y e altri. *J Agric Food Chem* 2007; 55: 1695-1701.
123. DuPont MS e altri. *J Agric Food Chem* 2000; 48: 3957-3964.
124. Edenharder R e altri. *Food Chem Toxicol* 1994; 32: 443-459.
125. Ejendal KF, Hrycyna CA. *Curr Protein Pept Sci* 2002; 3: 503-511.
126. Ernster L. *Methods Enzymol* 1967; 10: 309-317.
127. Escriva H e altri. *BioEssays* 2000; 22: 717-727.
128. Etminan M e altri. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13: 340-345.
129. Evans WE, Johnson JA. *Ann Rev Genomics Hum Genet* 2001; 2: 9-39.
130. Exon JH e altri. *J Toxicol Environ Health A* 1998; 53: 375-384.
131. Fakhoury M, Jacqz-Aigrain EJ. *Pediatrics* 2005; 116: 28-31.
132. Fang MZ e altri. *Cancer Res* 2003; 63: 7563-7570.
133. Feng YH e altri. *Acta Pharmacol Sin* 2002; 23: 893-897.
134. Fernández K e altri. *J Agric Food Chem* 2007; 55: 3675-3680.

135. Fleischauer AT e altri. *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 1047-1052.
136. Flohé L, Günzler WA. *Methods Enzymol* 1984; 105: 114-121.
137. Floreani M e altri. *Life Sci* 2003; 72: 2741-2750.
138. Foerster SB e altri. *Am J Prev Med* 1995; 11: 124-31.
139. Fontecave M e altri. *FEBS Lett* 1998; 421: 277-279.
140. Franco R e altri. *Cancer Lett* 2008; 266: 6-11.
141. Fraser GE. *J Clin Nutr* 2009; 89: 1607S-1612S.
142. Freedman ND e altri. *Int J Cancer* 2008; 122: 2330-2336.
143. Friedman M. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 5751-5780.
144. Fuccella LM e altri. "Trattato di farmacologia e terapia" 1998. Torino-UTET: 24-25.
145. Fuggetta MP e altri. *J Exp Clin Cancer Res* 2006; 25: 189-193.
146. Fukuda T e altri. *Biol Pharm Bull* 2003; 26: 271-273.
147. Fulda S, Debatin KM. *Eur J Cancer* 2005; 41: 786-798.
148. Fung TT e altri. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11: 1119-1122.
149. Galeone C e altri. *Am J Clin Nutr* 2006; 84: 1027-1032.
150. Galeone C e altri. *Urology* 2007; 70: 672-676.

151. Galeone C e altri. *Public Health Nutr* 2008; 1-4. (in press).
152. Garvin S e altri. *Cancer Lett* 2006; 231: 113-122.
153. Gautier H e altri. *J Agric Food Chem* 2008; 56: 1241-1250.
154. Gerhäuser C e altri. *Mutat Res* 2003; 523-524: 163-72.
155. Ghoneum M e altri. *Cancer Detection and Prevention* 1995; 19: 106.
156. Giguère V. *Endocr Rev* 1999; 20: 689-725.
157. Gil MI e altri. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 4976-4982.
158. Ginter E. *Bratisl Lek Listy* 2008; 109: 463-466.
159. Giovannucci E. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 317-331.
160. Giovannucci E. *Exp Biol Med (Maywood)* 2002; 227: 852-859.
161. Glade MJ. *Nutrition* 1999; 15: 523-526.
162. Glatt H e altri. *Mutat Res* 2001; 482: 27-40.
163. Glavinas H e altri. *Curr Drug Deliv* 2004; 1: 27-42.
164. Gledovic Z e altri. *Indian J Gastroenterol* 2007; 26: 265-268.
165. Goetz ME, Luch A. *Cancer Lett* 2008; 266: 73-83.
166. Goldberg J e altri. *Am J Epidemiol* 1998; 128: 700-710.

167. Gonzalez FJ, Nebert DW. *Trends Genet* 1990; 6: 182-186.
168. Gradelet S e altri. *Xenobiotica* 1996; 26: 49-63.
169. Greving JP e altri. *Br J Cancer* 2007; 97: 429-433.
170. Grønbaek M e altri. *Ann Intern Med* 2000; 133: 411-419.
171. Guendez R e altri. *Phytochem Anal* 2005; 16: 17-23.
172. Guengerich FP. *CRC Crit Rev Toxicol* 1985; 14: 259-307.
173. Guengerich FP. *Chem Res Toxicol* 2001; 14: 611-650.
174. Guengerich FP. *Mol Inter* 2003; 3: 194-204.
175. Guengerich FP. *The AAPS J* 2006; 8: E101-E111.
176. Guerre P e altri. *Life Sci* 1996; 58: 1883-1889.
177. Gutierrez A e altri. *Biochem Soc Trans* 2003; 31: 497-501.
178. Habig WH e altri. *J Biochem Chem* 1974; 249: 7130-7139.
179. Hagiwara A e altri. *Cancer Res* 1991; 51: 5655-5660.
180. Halliwell B. *Free Radic Res* 1996; 25: 439-454.
181. Halliwell B, Gutteridge JMC. Clarendon Press, Oxford, England 1999.
182. Halliwell B. *Biochem J* 2007; 401: 1-11.

183. Handschin C e altri. *Mol Endocr* 2001; 15: 1571-1585.
184. Handschin C, Meyer UA. *Pharmacol Rev* 2003; 55: 649-673.
185. Haslam E. Cambridge University Press 1998, Cambridge.
186. Havas S e altri. *Public Health Rep* 1995; 110: 68-79.
187. Hazai E e altri. *Bioorg Med Chem* 2006; 14: 6859-6867.
188. Hebbar V e altri. *Life Sci* 2005; 76: 2299-2314.
189. Heimendinger J, Chapelsky D. *Adv Exp Med Biol* 1996; 401: 199-206.
190. Heimler D e altri. *J Agric Food Chem* 2007; 55: 1724-1729.
191. Helen A e altri. *Vet Hum Toxicol* 1999; 41: 316-319.
192. Hiipakka RA e altri. *Biochem Pharmacol* 2002; 63: 1165-1176.
193. Hinson JA, Forkert PG. *Can J Physiol Pharmacol* 1995; 73: 1407-1413.
194. Hirose M e altri. *Cancer Res* 1991; 51: 824-827.
195. Hirose M e altri. *Carcinogenesis* 1992; 13: 1825-1828.
196. Hirose M e altri. *Carcinogenesis* 1998; 19: 207-212.
197. Hollenberg PF e altri. *Chem Res Toxicol* 2008; 21: 189-205.

198. Hooda PS. *J Sci Food Agric* 1997; 73: 446-454.
199. Horvath G e altri. *Plant Physiol Biochem* 2006; 44: 724-731.
200. Horvath Z e altri. *Exp Hematol* 2005; 33: 329-335.
201. Houde V e altri. *J Periodontol* 2006; 77: 1371-1379.
202. Hough RL e altri. *Environ Health Perspec* 2004; 112: 215-221.
203. Hrelia P e altri. *Mutagenesis* 1996; 11: 445-453.
204. Hsing AW e altri. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 1648-1651.
205. Hu FB. *Curr Opin Lipidol* 2002; 13: 3-9.
206. Hu H, Qin YM. *Chin Med J (Engl)* 2006; 119: 417-421.
207. Huang MT e altri. *Cancer Res* 1988; 48: 5941-5946.
208. Huang MT e altri. *Carcinogenesis* 1996; 17: 761-765.
209. Huang CN e altri. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 3674-3678.
210. Huynh HT, Teel RW. *Anticancer Res* 2002; 22: 1699-1703.
211. Ingelman-Sundberg M. *Trends Pharmacol Sciences* 2004; 25: 193-200.
212. Intawongse M, Dean JR. *Food Addit Contam* 2006; 23: 36-48.
213. Jang M e altri. *Science* 1997; 275: 218-220.

214. Jemal A e altri. *CA Cancer J Clin* 2008; 58: 71-96.
215. Jeong HG, Lee YW. *Cancer Lett* 1998; 134: 73-79.
216. Jewell C, O'Brien NM. *Br J Nutr* 1999; 81: 235-242.
217. Jiang Y e altri. *Anticancer Res* 2001; 21: 3349-3353.
218. Johnston CS e altri. *J Nutr* 2000; 130: 3063-3067.
219. Johnson EF. *Drug Metab Disp* 2003; 31: 1532-1540.
220. Joseph P, Jaiswal AK. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 8413–8417.
221. Kammerer D e altri. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 4360-4367.
222. Kaneko M e altri. *Carcinogenesis* 2002; 23: 1729-1735.
223. Kang SA e altri. *Free Radic Res* 1998; 28: 93-107.
224. Kapiszewska M. *Forum Nutr* 2006; 59: 130-153.
225. Kaplan LA e altri. *Clin Physiol Biochem* 1990; 8: 1-10.
226. Karekar V e altri. *Mutat Res* 2000; 468: 183-194.
227. Karihtala P, Soini Y. *APMIS* 2007; 115: 81-103.
228. Kasai H e altri. *Food Chem Toxicol* 2000; 38: 467-471.
229. Kato T e altri. *Mutat Res* 1998; 420: 109-114.

230. Kaul A, Khanduja KL. *Nutr Cancer* 1998; 32: 81-85.
231. Kawabata K e altri. *Carcinogenesis* 1999; 20: 2109-2115.
232. Keiss HP e altri. *J Nutr* 2003; 133: 2171-2175.
233. Key TJ e altri. *Am J Clin Nutr* 2009; 89: 1620S-1626S.
234. Kim YM e altri. *J Biol Chem* 1995; 270: 5710-5713.
235. Kim DJ e altri. *Biofactors* 2000; 13: 95-102.
236. King CD e altri. *Curr Drug Metab* 2000; 1: 143-161.
237. Klaunig JE, Kamendulis LM. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004; 44: 239-267.
238. Ko SH e altri. *J Med Food* 2005; 8: 41-416.
239. Kobayashi T e altri. *Anticancer Drugs* 1996; 7: 195-198.
240. Kobayashi Y e altri. *J Toxicol Sci* 2000; 25: 213-222.
241. Kobayashi H e altri. *Mutat Res* 2004 ; 558: 111–120.
242. Krinsky NI. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998; 218: 95-97.
243. Kucuk O e altri. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10: 861-868.
244. Kumar S, Bandyopadhyay U. *Toxicol Lett* 2005; 157: 175-188.
245. Kundu JK, Surh YJ. *Cancer Lett* 2008; 269: 243-261.

246. Kurahashi N e altri. *Br J Cancer* 2009; 100: 181-184.
247. Kuroiwa Y e altri. *Cancer Lett* 2006; 241: 275-280.
248. Kvam E e altri. *Free Radic Biol Med* 1999; 26: 511-517.
249. Kvam E e altri. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 1191-1196.
250. La Vecchia C e altri. *Epidemiology* 1998; 9: 208-210.
251. Laemmli UK. *Nature* 1970; 227: 680-685.
252. Lambert JD, Yang CS. *Mutat Res* 2003; 9474: 1-8.
253. Lampe JW, e altri. *Carcinogenesis* 2000; 21: 1157-62.
254. Lanzotti V. *J Chromatogr A* 2006; 1112: 3-22.
255. Lea MA e altri. *Nutr Cancer* 2002; 43: 90-102.
256. Lea MA e altri. *Anticancer Res* 2008; 28: 2067-2076.
257. Leal M e altri. *Toxicol Lett* 1999; 109: 1-10.
258. Lee SH e altri. *Science* 2001; 292: 2083-2086.
259. Lee JS, Surh YJ. *Canc Lett* 2005; 224: 171-184.
260. Lee KW e altri. *J Agric Food Chem* 2005; 53: 1990-1995.
261. Lee CK e altri. *Phytother Res* 2008; 22: 223-227.

262. Lee CK e altri. *Phytother Res* 2009; 23: 999-1005.
263. Lenaz G. *IUBMB Life* 2001; 52: 159-164.
264. Leonard SS e altri. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 309: 1017-1026.
265. Leonardi C e altri. *J Agric Food Chem* 2000; 48: 4723-4727.
266. Lesca P. *Carcinogenesis* 1983; 4: 1651-163.
267. Levi F e altri. *Eur J Cancer* 2005; 14: 139-142.
268. Levonen AL e altri. *Biochem J* 2004; 378: 373-382.
269. Lewis DF. *Pharmacogenomics* 2003; 4: 367-395.
270. Li ZG e altri. *Carcinogenesis* 2002; 23: 1531-1536.
271. Li H e altri. *Chin Med J (Engl)* 2004; 117: 1155-1160.
272. Li Y e altri. *Pharmacol Res* 2006; 53: 6-15.
273. Lian F, Wang XD. *Int J Cancer* 2008; 123: 1262-1268.
274. Liang YC e altri. *J Cell Biochem* 1997; 67: 55-65.
275. Liang YC e altri. *Carcinogenesis* 1999; 20: 733-736.
276. Liao HF e altri. *J Agric Food Chem* 2003; 51: 7907-7912.
277. Lillig CH e altri. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1780: 1304-1317.

278. Liska DJ. *Altern Med Rev* 1998; 3: 187-198.
279. Liu J e altri. *Carcinogenesis* 1992; 13: 1847-1851.
280. Liu C e altri. *Cancer Res* 2003; 63: 3138-3144.
281. Liu A e altri. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 2879-2885.
282. Locatelli GA e altri. *Biochem J* 2005; 389: 259-268.
283. Loft S, Poulsen HE. *J Mol Med* 1996; 74: 297-312.
284. Lois R. *Planta* 1994; 4: 498-503.
285. Long LH e altri. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 273: 50-53.
286. Losa GA. *Eur J Clin Invest* 2003; 33: 818-823.
287. Lowe GM e altri. *Free Radic Res* 1999; 30: 141-51.
288. Lowry OH e altri. *J Biochem* 1951; 193: 265-275.
289. Lu R, Serrero G. *J Cell Physiol* 1999; 179: 297-304.
290. Lubet RA e altri. *Arch Biochem Biophys* 1985; 238: 43-48.
291. Lutz U e altri. *Fundam Appl Toxicol* 1997; 39: 131-137.
292. Mackenzie PI, Hanninen O. *Anal Biochem* 1980; 109: 362-368.
293. Mares-Perlman JA e altri. *Am J Epidemiol* 1995; 14: 322-334.

294. Marklund S, Marklund G. *Eur J Biochem* 1974; 47: 469-474.
295. Markus MA, Morris BJ. *Clin Interv Aging* 2008; 3: 331-339.
296. Martinez J, Moreno JJ. *Biochem Pharmacol* 2000; 59: 865-870.
297. Masuda M e altri. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 4220–4229.
298. Masuda M e altri. *J Exp Ther Oncol* 2002; 2: 350–359.
299. Matos HR e altri. *Arch Biochem Biophys* 2001; 396: 171-177.
300. Matsunaga K e altri. *Asian Pac J Cancer Prev* 2002; 3: 163-166.
301. Matsuoka A e altri. *Mut Res* 2001; 494: 107–113.
302. Matsuoka A e altri. *Mut Res* 2002; 521: 29–35.
303. Matsuzawa T e altri. *J Toxicol Sci* 1997; 22: 25-44.
304. Mattina MI e altri. *Environ Pollut* 2003; 124: 375-378.
305. McKinnon RA, Evans AM. *Aust J Hosp Pharm* 2000; 30: 102-105.
306. Melov S e altri. *Nat Genet* 1998; 18: 159-163.
307. Mench M e altri. *Environ Pollut* 1994; 86: 279-286.
308. Mertens-Talcott SU, Percival SS. *Cancer Lett* 2005; 218: 141-151.

309. Mestres J. *Proteins* 2005; 58: 596-609.
310. Meyer UA. *J Pharmacokinet Biopharm* 1996; 24: 449-459.
311. Meyer UA, Zanger UA. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1997; 37: 269-296.
312. Meyer UA. *Nat Rev Genet* 2004; 5: 669-676.
313. Miedema I e altri. *Am J Epidemiol* 1993; 138: 37-45.
314. Miller ER 3rd e altri. *Ann Intern Med* 2005; 142: 37-46.
315. Miller A, Adeli K. *Curr Opin Gastroenterol* 2008; 24: 204-209.
316. Minoggio M e altri. *Ann Nutr Metab* 2003; 47: 64-69.
317. Mirmiran P e altri. *Metabolism* 2009; 58: 460-468.
318. Mitchell SH e altri. *Cancer Res* 1999; 59: 5892-5895.
319. Mittal A e altri. *Carcinogenesis* 2003; 24: 1379-1388.
320. Mizuno N e altri. *Pharmacol Rev* 2003; 55: 425-461.
321. Moon YJ e altri. *Toxicol In Vitro* 2006; 20: 187-210.
322. Morse MA, Stoner GD. *Carcinogenesis* 1993; 14: 1737-1746.
323. Mossine VV e altri. *Cancer Res* 2008; 68: 4384-9431.
324. Mucci LA e altri. *BJU Int* 2001; 87: 814-820.

325. Muller M, Anke M. *Sci Total Environ* 1994; 156: 151-158.
326. Müller M, Kersten S. *Nat Rev Genet* 2003; 4: 315-321.
327. Murray M. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1997; 24: 465-470.
328. Na HK e altri. *Cancer Lett* 2000; 157: 31-38.
329. Naasani I e altri. *Cancer Res* 2003; 63: 824-830.
330. Nagasawa H e altri. *Anticancer Res* 1995; 15: 1173-1178.
331. Nahum A e altri. *Oncogene* 2001; 20: 3428-3436.
332. Nakagawa H e altri. *Carcinogenesis* 2001; 22: 891-897.
333. Nakajima T, Aoyama T. *Ind Health* 2000; 38: 143-152.
334. Narisawa T e altri. *Jpn J Cancer Res* 1998; 89: 1003-1008.
335. Nash T. *Biochem J* 1953; 55: 416-421.
336. National Academy of Sciences. National Academy press
Washington, DC 1982.
337. National Academy of Sciences. National Academy press
Washington, DC 1989.
338. Nebert DW e altri. *DNA Cell Biol* 1991; 10: 1-14.
339. Nebert DW. *Biochem Pharmacol* 1994; 47: 25-37.
340. Neuhouser ML. *Nutr Cancer* 2004; 50: 1-7.

341. Neuwirt H e altri. *Prostate* 2008; 68: 1647-1654.
342. Nguyen T e altri. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 2003; 43: 233-260.
343. Nicolle C e altri. *Clin Nutr* 2004; 23: 605-614.
344. Nielsen M e altri. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 275: 804-809.
345. Niles RM e altri. *J Nutr* 2006; 136: 2542-2546.
346. Nioi P, Hayes JD. *Mutat Res* 2004; 555: 149-171.
347. Nutter LM e altri. *J Biol Chem* 1992; 267: 2474-2479.
348. Nyby MD e altri. *Hypertens Res* 2007; 30: 451-457.
349. Oikawa S e altri. *Free Radic Res* 2003; 37: 881-890.
350. Okajima E e altri. *Jpn J Cancer Res* 1998; 89: 22-26.
351. Omenn GS e altri. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1550-1559.
352. Omura T, Sato R. *J Biol Chem* 1964; 239: 2370-8.
353. Orellana M, Guajardo V. *Rev Med Chile* 2004; 132: 85-94.
354. Pannala AS e altri. *FEBS Lett* 1998; 423: 297-301.
355. Paolini M e altri. *Mutat Res* 1983; 110: 221-230.

356. Paolini M e altri. *Mutat Res* 1992; 281: 245-246.
357. Paolini M, Legator MS. *Nature* 1992; 375: 448.
358. Paolini M e altri (a). *Trends Pharmacol Sci* 1994; 15: 322-323.
359. Paolini M e altri (b). *Toxicol Environ Chem* 1994; 44: 43-53.
360. Paolini M e altri (c). *Toxicol Environ Chem* 1994; 44: 55-64.
361. Paolini M e altri. *J Investig Med* 1996; 44: 470-473.
362. Paolini M e altri. *Cancer Detec Prev* 1998; 22: 68-74.
363. Paolini M. *Tox Appl Pharmacol* 1998; 152: 293-294.
364. Paolini M e altri. *Life Sci* 1999; 65: 75-79.
365. Paolini M e altri. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 1110-1111.
366. Paolini M, Nestle M. *Mutat Res* 2003; 543: 181-189.
367. Paolini M e altri. *Lancet* 2003; 361: 257-258.
368. Paolini M e altri *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25: 124-129.
369. Pattison DI, Davies MJ. *EXS* 2006; 96: 131-157.
370. Pedersen A e altri. *Gut* 2003; 52: 861-867.
371. Perchellet JP e altri. *Cancer Biochem Biophys* 1986; 8: 299-312.

372. Pèrez A, Gago G. *Nahrung* 1991; 35: 369-371.
373. Peris M e altri. *Sci Total Environ* 2007; 378: 42-48.
374. Pervaiz S, Clement MV. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 1297-1304.
375. Petterino C, Argentino-Storino A. *Exp Toxicol Pathol* 2006; 57: 213-219.
376. Pinto JT e altri. *Am J Clin Nutr* 1997; 66: 398-405.
377. Piper JT e altri. *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30: 445-456.
378. Platt KL e altri. *J Biochem Toxicol* 1989; 4: 1-6.
379. Podmore ID e altri. *Nature* 1998; 392: 559.
380. Powolny AA e altri. *Cancer Lett* 2008; 269: 305-314.
381. Presteria T e altri. *PNAS USA* 1993; 90: 2965-2969.
382. Radomska-Pandya A e altri. *Drug Metab Rev* 1999; 31: 817-899.
383. Rao CV e altri. *Chem Biol Interact* 1992; 84: 277-290.
384. Rao AV, Rao LG. *Pharmacol Res* 2007; 55: 207-216.
385. Ray SD e altri. *Mutat Res* 2005; 579: 81-106.
386. Reddy L e altri. *Pharmacol Ther* 2003; 99: 1-13.

387. Reinke LA, Moyer MJ. *Drug Metab Disp* 1985; 13: 548-552.
388. Renaud S, de Lorgeril M. *Lancet* 1992; 339: 1523-1526.
389. Renaud SC e altri. *Arch Intern Med* 1999; 159: 1865-1870.
390. Rettie AE. *Handbook of drug metabolism* 1999: 131-147.
391. Revel A e altri. *J Appl Toxicol* 2003; 23: 255-261.
392. Reynolds T. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83: 1538-1539.
393. Riboli E, Norat T. *Am J Clin Nutr* 2003; 78: 559S-569S.
394. Rice-Evans CA e altri. *Free Radic Res* 1997; 26: 381-398.
395. Robinson-Rechavi M e altri. *J Cell Sci* 2003; 116: 585-586.
396. Rose P e altri. *Nat Prod Rep* 2005; 22: 351-368.
397. Rushmore YH, Tony Kong AN. *Curr Drug Metab* 2002; 3: 481-490.
398. Russo GL. *Biochem Pharmacol* 2007; 74: 533-544.
399. Sanjoaquin MA e altri. *Public Health Nutr* 2004; 7: 77-83.
400. Sauerbeck DR. *Water, Air and Soil Pollution* 1991; 57/58: 227-237.
401. Sautin YY e altri. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 293: C584-596.

402. Sayyah M e altri. *J Ethnopharmacol* 2004; 92: 325-329.
403. Schedin P, Elias A. *Breast Cancer Res* 2004; 6: 93-101.
404. Schoonen WM e altri. *Int J Cancer* 2005; 113: 133-140.
405. Scott EE e altri. *PNAS* 2003; 100: 13196-13201.
406. Scott EE e altri. *J Biol Chem* 2004; 279: 27294-27301.
407. Sengupta A e altri. *Eur J Cancer Prev* 2006; 15: 301-305.
408. Serafini M e altri. *Br J Nutr* 2002; 88: 615-623.
409. Setiawan VW e altri. *Asian Pac J Cancer Prev* 2005; 6: 387-395.
410. Severino G, Del Zoppo M. *Caleidoscopio* 2004; 177: 23-29.
411. Sharma SD, Katiyar SK. *Carcinogenesis* 2006; 27: 95-102.
412. Sharoni Y e altri. *Cancer Detect Prev* 1997; 21:118-123.
413. Sheehan D e altri. *Biochem J* 2001; 360: 1-16.
414. Shenoy NR, Choughuley AS. *Cancer Lett* 1992; 65: 227-232.
415. Shi J e altri. *Biofactors* 2004; 21: 203-210.
416. Shigeoka Y e altri. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004; 130: 146-152.
417. Shimizu M e altri. *J Toxicol Sci* 1999; 24: 433-439.

418. Shureiqi I e altri. *Crit Rev Onc/Hematol* 2000; 33: 157-167.
419. Siler U e altri. *FASEB J* 2004; 18: 1019-1021.
420. Siler U e altri. *J Nutr* 2005; 135: 2050S-2052S.
421. Singh SV e altri. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 225: 660-665.
422. Singh RP e altri. *Int J Cancer* 2004; 108: 733-740.
423. Singletary KW, Meline B. *Nutr Cancer* 2001; 39: 252-258.
424. Sivam GP e altri. *Nutr Cancer* 1997; 27: 118-1121.
425. Slimestad R e altri. *J Agric Food Chem* 2007; 55: 10067-10080.
426. Smith MA e altri. *J Neurosci* 1997; 17: 2653-2657.
427. Sofi F e altri. *BMJ* 2008; 337: a1344.
428. Son TG e altri. *Neuromolecular Med* 2008;10: 236-246.
429. Song YS e altri. *Cancer Lett* 2002; 175: 53-61.
430. Soni KB e altri. *Cancer Lett* 1997; 115: 129-133.
431. Sonin NV e altri. *Shock* 1999; 11: 175-179.
432. Sonoda J, Evans RM. *Pure Appl Chem* 2003; 75: 1733-1742.
433. Sparks R e altri. *Breast Cancer Res* 2004; 6: R488-R498.

434. Sporn MB e altri. *Fed Proc* 1976; 35: 1332-1338.
435. Stanner SA e altri. *Public Health Nutr* 2004; 7: 407-422.
436. Steinmetz KA, Potter JD. *Cancer Causes Control* 1991; 2: 325-357.
437. Stewart AJ e altri. *J Agric Food Chem* 2000; 48: 2663-2669.
438. Stoner GD e altri. *Environ Health Perspect* 1997; 105: 945-954.
439. Subar AS e altri. Rockville, MD: National Cancer Institute 1992.
440. Sud'ina GF e altri. *FEBS Lett* 1993; 329: 21-24.
441. Sugisawa A e altri. *Biol Pharm Bull* 2004; 27: 1459-1461.
442. Sun J e altri. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 7449-7454.
443. Sun CY e altri. *Acta Pharmacol Sin* 2006; 27: 1447-1452.
444. Sundaram SG, Milner JA. *J Nutr* 1996; 126: 1355-1361.
445. Surh YJ. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 768-780.
446. Suttner DM, Dennery PA. *FASEB J* 1999; 13: 1800-1809.
447. Szaefer H e altri. *Nutr Cancer* 2004; 48: 70-77.
448. Szaefer H e altri. *Toxicology* 2008; 251: 28-34.
449. Talalay P, Fahey JW. *J Nutr* 2001; 131: 3027S-3033S.

450. Tanaka T e altri. *Basic Life Sci* 1990; 52: 429-440.
451. Tanaka T e altri. *Carcinogenesis* 1993; 14: 1321-1325.
452. Tanaka E. *J Clin Pharm Ther* 1999; 24: 323-329.
453. Tanaka S e altri. *J Nutr* 2006; 136: 821S-826S.
454. Tang Z e altri. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao* 1997; 22: 246-248. (Abstract)
455. Tang L e altri. *J Nutr* 2005; 135: 287-290.
456. Teel RW, Huynh H. *Cancer Lett* 1998; 133: 135-141.
457. The Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group. *N Engl J Med* 1994; 330: 1029-3105.
458. Thomasset SC e altri. *Int J Cancer* 2007; 120: 451-458.
459. Tilli CM e altri. *Arch Dermatol Res* 2003; 295: 117-123.
460. Tomás-Barberán FA e altri. *J Agric Food Chem* 2001; 49: 4748-4760.
461. Toninello A e altri. *Amino Acids*. 2004; 26: 339-343.
462. Towbin H e altri. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 4350-4354.
463. Tsao AS e altri. *CA Cancer J Clin* 2004; 54: 150-180.
464. Tsuda H e altri. *Drug Metab Pharmacokinet* 2004; 19: 245-263.

465. Turner AP. John Wiley & Sons, Chischester 1994; 153-187.
466. Upham BL e altri. *Carcinogenesis* 1997; 18: 37-42.
467. Valko M e altri. *Mol Cell Biochem* 2004; 266: 37-56.
468. Valko M e altri. *Chem Biol Interact* 2006; 160: 1-40.
469. Valko M e altri. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84.
470. van der Logt EM e altri. *Carcinogenesis* 2003; 24: 1651-1656.
471. van Duijnhoven FJ e altri. *Am J Clin Nutr* 2009; 89: 1441-1452.
472. Vastag B. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 474-476.
473. Velmurugan B e altri. *Eur J Cancer Prev* 2002; 11: 19-26.
474. Velmurugan B e altri. *Nutrition* 2004; 20: 812-816.
475. Vrzal R e altri. *Biomed Papers* 2004; 148: 3-10.
476. Wang CJ e altri. *Cancer Lett* 1989; 48: 135-142.
477. Wang M e altri. *PNAS* 1997; 94: 8411-8416.
478. Wang Y e altri. *Toxicol Sci* 2006; 92: 71-77.
479. Wargovich MJ. *J Nutr* 2006; 136: 832S-834S.
480. Watabe M e altri. *J Biol Chem* 2004; 279: 6017-6026.
481. Wattenberg LW. *Cancer Res* 1985; 45: 1-8.

482. Webb PM e altri. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13: 592-599.
483. Weber WW. *Pharmacogenetics* 1997; Oxford University Press, New York.
484. Weinshilboum RM e altri. *FABS J* 1997; 11: 3-14.
485. Wheeler CR e altri. *Anal Biochem* 1990; 184: 193-199.
486. Winterbourn CC. *Biochem J* 1981; 198: 125-131.
487. Wood ZA e altri. *Trends Biochem Sci* 2003; 28: 32-40.
488. Woodall AA e altri. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1336: 575-586.
489. World Health Organization. *World Cancer Report* 2008.
490. Wu WS. *Cancer Metastasis Rev* 2006; 25: 695-705.
491. www.5aday.org
492. Xiao D e altri (a). *Clin Cancer Res* 2006; 12: 6836-6843.
493. Xiao D e altri (b). *Nutr Cancer* 2006; 55: 94-107.
494. Xibib S e altri. *Asian Pac J Cancer Prev* 2003; 4: 119-124.
495. Xie W, Evans RM. *J Biol Chem* 2001; 276: 37739-37742.
496. Xu C e altri. *Arch Pharm Res* 2005; 28: 249-268.

497. Yang CS e altri (a). *J Nutr* 2001; 131: 1041S-1045S.
498. Yang CS e altri (b). *Annu Rev Nutr* 2001; 21: 381-406.
499. Yeh CT e altri. *J Agric Food Chem* 2003; 51: 1474-1479.
500. You WC e altri. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98: 974-983.
501. Young JF e altri. *J Agric Food Chem* 2007; 55: 618-623.
502. Yu LJ e altri. *Neoplasia* 2008; 10: 736-744.
503. Zang LY e altri. *Mol Cell Biochem* 2003; 247: 205-210.
504. Zell JA e altri. *Nutr Cancer* 2007; 59: 36-45.
505. Zhan C, Yang J. *Pharmacol Res* 2006; 53: 303-309.
506. Zhang Y. *Mutat Res* 2004; 555: 173-190.
507. Zhang ZM e altri. *Chin Med J (Engl)* 2007; 120: 1336-1342.
508. Zhang CX e altri. *Int J Cancer* 2009; 125: 181-188.
509. Zheng T e altri. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1993; 29B: 45-55.
510. Zhou HB e altri (a). *World J Gastroenterol* 2005; 11: 280-284.
511. Zhou DM e altri (b). *Chemosphere* 2005; 59: 167-175.
512. Ziegler CC e altri. *J Nutr* 2004; 134: 5-10.