

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

Scienze Farmacologiche e Tossicologiche, dello
Sviluppo e del Movimento Umano

Ciclo XVIII

Settore Concorsuale di afferenza: 05/G1

Settore Scientifico disciplinare: BIO 14

TITOLO TESI

Effetti della Vitamina E sul metabolismo degli xenobiotici
e sull'omeostasi ossidoriduttiva

Presentata da:

Dott. Fabio Vivarelli

Coordinatore Dottorato:

Chiar.ma Prof.ssa Patrizia Hrelia

Relatore:

Chiar.mo Prof. Moreno Paolini

Correlatore

Dott.ssa Donatella Canistro

Esame finale anno 2016

Indice

1. INTRODUZIONE

1.1. Chemioprevenzione	1
1.1.1. Generalità	1
1.1.2. Composti fitochimici e chemioprevenzione	2
1.1.3. Chemioprevenzione ed epigenetica	3
1.1.4. Agenti bloccanti	4
1.1.5. Enzimi del metabolismo e teoria chemiopreventiva classica	5
1.1.6. Limiti della teoria chemiopreventiva classica	6
1.1.7. Chemioprevenzione: stato dell'arte	8
1.1.8. Frutta e verdura	8
1.1.9. β -carotene	9
1.1.10. Vitamina C e vitamina E	10
1.2. Stress ossidativo radicali e cancro	12
1.2.1. Generalità	12
1.2.2. Ruolo dei ROS nella cancerogenesi	14
1.2.3. Antiossidanti	16
1.2.4. Principali sistemi antiossidanti enzimatici	17
1.2.5. Attività chemiopreventiva degli antiossidanti naturali: gli studi clinici	19
1.2.6. Studi sul ruolo chemiopreventivo del tocoferolo	21
1.3. Vitamina E	22
1.3.1. Cenni storici	22
1.3.2. Metabolismo e modulazione del CYP450	23
1.4. Enzimi del metabolismo degli xenobiotici	27
1.4.1. Generalità	27
1.4.2. Enzimi di fase I	28

1.4.3. Enzimi di fase II	29
1.4.4. Enzimi di fase III	31
1.4.5. Induzione degli enzimi del drug-metabolism e co-cancerogenesi	31
1.4.6. Principali meccanismi d'induzione del CYP450	32
1.4.7. Aspetti clinici dell'induzione del CYP450	33

2. SCOPO DELLA RICERCA **36**

3. MATERIALI E METODI **39**

3.1. Esperimento <i>in vivo</i>	39
3.1.1. Trattamento animale	39
3.1.2. Preparazione della frazione microsomiale e citosolica	40
3.1.3. Determinazione della concentrazione proteica nelle frazioni cellulari (metodo di Lowry).	41
3.1.4. Enzimi di fase I	41
3.1.4.1. Citocromo P450	41
3.1.4.2. NADPH-citocromo (P450)-c-reduttasi	41
3.1.4.3. Amminopirina N-demetilasi (APND)	42
3.1.4.4. p-Nitrofenolo idrossilasi (pNFI)	43
3.1.4.5. Pentossiresorufina O-dealchilasi (PROD) Metossiresorufina O-demetilasi (MROD) Etossiresorufina O-deetilasi (EROD)	44
3.1.4.6. Etossicumarina O-deetilasi (ECOD)	45
3.1.5. Enzimi di fase II	46
3.1.5.1. Glutazione S-transferasi (GST)	46
3.1.4.2. UDP-glucuronosil-transferasi (UDPGT)	47
3.1.6. Enzimi antiossidanti	47
1.1.6.1. Catalasi (CAT)	47
3.1.6.2. DT-diaforasi	47

3.1.7. Estrazione dell'RNA e preparazione del cDNA	48
3.1.7.1. Estrazione dell'RNA totale	48
3.1.7.2. Quantificazione e controllo dell'RNA	48
3.1.7.3. Trattamento con DNasi e retrotrascrizione dell'RNA	49
3.1.7.4. Controlli utilizzati per la RT-PCR	49
3.1.7.5. Real-time PCR	49
3.1.7.6. Primer utilizzati	50
3.1.8. Spettroscopia di risonanza di spin elettronico (EPR) abbinata alla tecnica radical trapping per la determinazione dello stress ossidativo (OSS)	51
3.2. Esperimento <i>in vitro</i>	53
3.2.1. Test di vitalità cellulare	53
3.2.2. Test ELISA per la determinazione della prostaglandina E ₂ (PGE ₂)	54
3.2.3. Spettroscopia di risonanza di spin elettronico (EPR) abbinata alla tecnica radical trapping per la determinazione dello stress ossidativo (OSS)	54
3.2.4. Estrazione dell'RNA e RT-PCR	54
3.3. ANALISI STATISTICA	55
4. RISULTATI	56
<hr/>	
4.1. Effetti della vitamina E sugli enzimi del <i>drug-metabolism</i>	56
4.1.1. Sistema monoossigenasico epatico	57
4.1.2. Sistema monoossigenasico nel rene	60
4.1.3. Sistema monoossigenasico nella prostata	63
4.1.4. Enzimi di fase-II (GST, UDPGT) nel fegato	68
4.1.5. Enzimi di fase-II (GST UDPGT) nel rene	68
4.2. Effetti della vitamina E sugli enzimi antiossidanti	72
4.2.1. Enzimi antiossidanti epatici	72
4.2.2. Enzimi antiossidanti nel rene	73

4.3. Effetti della vitamina E sullo stress ossidativo (OSS) in tessuto mediante EPR	77
4.3.1. OSS nel rene	77
4.3.2. OSS in prostata	77
4.4. Effetti della vitamina E sulle cellule RWPE-1 di epitelio di prostata umana	80
4.4.1. Test di vitalità cellulare mediante sulforodamina B (SRB)	80
4.4.2. Effetti della vitamina E sull'espressione genica di alcune isoforme del citocromo P450 (CYP) in cellule RWPE-1 di epitelio di prostata umana esposte alla concentrazione di 100µM per 48 ore	81
4.4.2. Effetti della vitamina E su prostaglandina E ₂ (PGE ₂) e cicloossigenasi-2 (COX-2) in cellule RWPE-1 di epitelio di prostata umana esposte alla concentrazione di 100µM per 48 ore	84
4.4.4. OSS su cellule RWPE-1 trattate con vitamina E (100µM per 48 ore)	86
<u>5. DISCUSSIONE</u>	<u>88</u>
<u>6. CONCLUSIONI</u>	<u>100</u>
<u>7. BIBLIOGRAFIA</u>	<u>101</u>

RIASSUNTO

Negli ultimi decenni, in virtù delle eccellenti proprietà antiossidanti della vitamina E (VE), la possibile associazione tra questa e la riduzione dell'incidenza di patologie neoplastiche è stata studiata mediante numerosi trial clinici. I risultati sono però ambigui e l'impiego della VE come agente chemiopreventivo su larga scala è oggi più che mai al centro del dibattito scientifico. *Il Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT)* ha addirittura evidenziato un rischio d'incidenza più alto per il cancro alla prostata nel gruppo d'intervento in cui è stata somministrata la VE. Tuttavia, il meccanismo d'azione non è noto.

Poiché la VE induce l'espressione di alcune isoforme del P450 nel fegato e poiché tale induzione è associata ad un aumento della produzione di specie reattive centrate sull'ossigeno, ci siamo posti il problema di come un'eventuale *up-regulation* a livello prostatico avrebbe potuto generare uno stress ossidativo responsabile del fenomeno di cui sopra.

Il presente lavoro ha mostrato come la VE provochi una marcata induzione delle isoforme CYP1A1, CYP1A2, e CYP1B1/2 nel rene e nella prostata di ratto trattato *i.p.* con VE (100 o 200 mg/kg p.c. per sette o quattordici giorni consecutivi), e nel rene una generale inattivazione degli enzimi post-ossidativi GST e UDPGT ed una riduzione della potenzialità antiossidante. La spettroscopia EPR abbinata alla tecnica radical trapping ha rilevato una generazione anomala di radicali liberi in entrambi i tessuti.

I risultati sono stati confermati *in vitro* in cellule epiteliali di prostata umana RWPE-1 esposte alla VE. Insieme ad un aumento dell'espressione genica (mRNA) di differenti CYPs, è stato osservato un incremento di radicali liberi e della prostaglandina E₂ (PGE₂) rispetto al controllo.

Lo studio indica che la VE induce la superfamiglia CYP e uno stress ossidativo a livello prostatico (co-cancerogenesi) e può contribuire a spiegare i risultati inaspettati del trial SELECT.

ABSTRACT

Several meta-analysis and randomized clinical trials have seriously questioned chemoprevention based on vitamins including vitamin E (VE). Recently, the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT) has pointed out an increased risk for prostate cancer among VE long-term users. However, to date, the mechanism underlying these findings still remain unknown. Evidence from both *in vitro* and *in vivo* models reported how VE might increase the expression of hepatic cytochrome P450 (CYP). Induction may increase the biotransformation of ubiquitous pre-carcinogens and trigger an over-production of oxygen centred radicals (ROS) in the target tissue. We hypothesized that if such phenomenon occurred also in the prostate, it could contribute to explain the SELECT unexpected data. Male Sprague-Dawley rats were daily treated *i.p.* with either 100 or 200 mg/kg b.w. for 7 or 14 consecutive days. A powerful booster effect of various CYP isoforms such as CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1/2, coupled with a marked free radical over-generation were recorded in renal and prostate tissues. VE treatment led to a wide down-regulation of antioxidant (catalase, NAD(P)H:quinone reductase) and phase II enzymes (glutathione S-transferase, UDP-glucuronosyl transferase capability). Results observed in the *in vivo* study were consistent with those obtained by the use of a RWPE-1 human prostate cell based model. Compared to the control RWPE-1, cells exposed to VE reported a general CYP up-regulation associated with a higher content of free radicals. Interestingly, VE treatment also induced the cyclooxygenase (COX-2) expression with a consequently increased of the prostaglandin E₂ levels. The present study suggests that VE can act as a co-carcinogen and pro-oxidant agent. If such epigenetic mechanisms occur in human, may contribute to explain the harmful outcomes raised up from the SELECT study.

1. Introduzione

1.1. Chemioprevenzione

1.1.1. Generalità

Il termine chemioprevenzione introdotto per la prima volta nel 1976 da Michael Sporn, indica l'utilizzo di farmaci, sostanze biologiche o elementi nutritivi in grado di inibire, ritardare o invertire il processo di cancerogenesi, prima della fase invasiva di malattia (Sporn M.B. et al., 1976). La chemioprevenzione è da sempre ritenuta un'efficace strategia per ridurre il rischio di cancro: infatti, diversi studi suggeriscono che l'utilizzo di determinati agenti definiti chemiopreventivi, possa ritardare o talvolta fermare il processo cancerogenetico in diversi organi tra cui la cavità orale, l'esofago, lo stomaco, il colon retto, il polmone, la mammella e la prostata. (Tsao A.S. et al., 2004).

La chemioprevenzione viene suddivisa da un punto di vista clinico in primaria, secondaria e terziaria. La chemioprevenzione primaria è rivolta alla popolazione generale, in particolar modo ai soggetti che presentano fattori di rischio per la patologia neoplastica. Ai pazienti cui è stata diagnosticata una lesione preneoplastica alla quale si associa il rischio di una progressione verso la malattia conclamata, sono rivolte le strategie di chemioprevenzione secondaria. È opportuno specificare che da alcuni anni la comunità scientifica è concorde nel considerare la chemioprevenzione primaria e secondaria come facenti parte di un unico insieme di protocolli di intervento che assumono il nome di "prevenzione primaria". L'utilizzo di farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS) così come l'arricchimento della dieta con alcune molecole di origine vegetale, sono esempi di chemioprevenzione primaria, nella sua accezione più ampia.

La chemioprevenzione terziaria ha l'obiettivo di bloccare eventuali fenomeni recidivanti in pazienti che sono già stati sottoposti al protocollo terapeutico.

A livello molecolare la chemioprevenzione del cancro si basa sul blocco di alcuni processi intercellulari che coinvolgono le tre fasi fondamentali della cancerogenesi: iniziazione, promozione e progressione (Steward W.P. et al., 2013).

Gli agenti definiti "bloccanti" inibiscono l'interazione mutagena con il DNA preservandone l'integrità, ostacolando quindi che la fase d'iniziazione. L'inattivazione diretta o la metabolizzazione di molecole cancerogene, il sequestro di radicali liberi, o l'induzione degli enzimi antiossidanti, sono alcune delle modalità di azione degli agenti bloccanti (Shu L. et al., 2010).

Gli "agenti soppressori", interferiscono con le fasi più tardive della cancerogenesi (promozione e progressione), inibendo la proliferazione cellulare, deregolando la trasduzione del segnale mediata da NF-kB, mTOR, o fattori di trascrizione come STAT, e riducendo l'attività enzimatica citocromo P450 dipendente (Kristin R. et al., 2014).

1.1.2. Composti fitochimici e chemioprevenzione

Diverse molecole di origine vegetale hanno mostrato spiccate attività chemiopreventive riportando effetti inibitori in tutte le fasi della cancerogenesi (Slemenova D. et al., 2013). In particolare, molti di questi composti sono in grado di prevenire la fase di iniziazione, preservando il DNA, attraverso la modulazione degli enzimi ad azione citoprotettiva.

Le piante appartenenti alla famiglia delle *brassicaceae* costituiscono una ricca fonte di isotiocianati, tali molecole, assunte tramite la dieta, esplicano la loro azione chemioprotettiva principalmente attraverso l'attivazione del fattore Nrf2 e al

conseguente aumento della trascrizione di geni codificanti per enzimi che ricoprono un ruolo chiave nei processi di detossificazione e antiossidanti (Hybertson B.M. et al., 2011; Reuland D.J. et al., 2013). In condizioni fisiologiche Nrf2 è in larga parte legato a Kelch-like ECH-associating protein 1 (Keap 1), in condizioni di alterazione dell'omeostasi basale (stress ossidativo), Nrf2 viene rilasciato ed è quindi libero di traslocare nel nucleo, dove dopo l'associazione con Mafs, l'eterodimerò così formato potrà legare la regione "antioxidant responsive elements" (ARE) con conseguente attivazione della trascrizione dei geni target di Nrf2, tra cui quelli codificanti per l'enzima glutatione S-transferasi (GST), e NADPH: chinone reduttasi (NQO1), ai quali viene riconosciuto un importante ruolo nel limitare i danni al DNA (Das B.N. et al., 2013). Studi epidemiologici confermano, infatti, un aumento dell'incidenza di cancro nei pazienti che presentano deficienze per gli enzimi post ossidativi, così come, è ormai nota da qualche tempo la maggiore prevalenza di tumori legati al fumo nelle popolazioni che presentano il genotipo nullo per l'enzima GST M1 (Wilkinson J. 4th et al., 1997).

1.1.3. Chemioprevenzione ed epigenetica

Nonostante oltre il 90% delle forme tumorali presentano una o più mutazioni a livello somatico, negli ultimi anni, la comunità scientifica ha rivolto grande attenzione al contributo degli effetti di natura epigenetica su questa patologia. Alterazioni dell'espressione genica non accompagnate da modifiche del genoma, la metilazione a carico della citosina nelle isole CpG, così come, il fenomeno di acetilazione o metilazione delle catene laterali degli istoni, e infine, il ruolo dell'RNA non codificante, sembrano essere i principali aspetti coinvolti nella patologia tumorale (Shankar S. et al., 2013).

La metilazione del DNA è considerata una delle alterazioni a livello epigenetico più comuni, una alterata attività della DNA metil-transferasi (DNMT), e il conseguente stato di ipermetilazione delle regioni CpG determina il silenziamento di geni oncosoppressori. Al contrario, un'inattivazione della DNMT è responsabile di uno stato di instabilità cromosomica ed è associato ad un aumento dell'espressione di alcuni oncogeni (Kristin R. et al., 2014).

1.1.4. Agenti bloccanti

In assenza di stimoli, i fattori di trascrizione appartenenti alla famiglia NF- κ B, sono legati alle proteine I κ B, formando eterodimeri, in questo modo NF- κ B, rimane sequestrato a livello citoplasmatico. Uno stimolo pro infiammatorio da parte di citochine come ad esempio il TNF- α , innesca una serie di reazioni che portano alla fosforilazione di I κ B mediante IKK (I κ B chinasi), con conseguente ubiquitinazione e degradazione da parte del proteasoma (Karin M. et al., 2000).

L'espressione di oltre 150 geni è regolata da NF- κ B, e molti di essi ricoprono un ruolo chiave nei processi cellulari di apoptosi (Van Antwerp D.J. et al., 1996), proliferazione (Joyce D. et al., 2001), e progressione tumorale (Huang S. et al., 2001).

Il ruolo centrale dell'infiammazione nei processi di cancerogenesi come l'iniziazione e la progressione tumorale, è ampiamente riconosciuto (Hanahan D. et al., 2011), e questo ha portato a considerare l'utilizzo di composti antiinfiammatori come possibili candidati per i programmi di chemioprevenzione terziaria. Numerose sostanze di origine vegetale, che sono state proposte come potenziali chemioterapici, avevano caratteristiche antiinfiammatorie che si esplicavano inibendo il segnale mediato da NF- κ B (Weng C.J. et al., 2012), è il caso della curcuma, del resveratrolo, e di alcuni polifenoli estratti dal the come l'epigallocatechina-3-gallato (Kristin R. et al., 2014).

1.1.5. Enzimi del metabolismo e teoria chemiopreventiva classica

Gli enzimi di fase I, di cui il citocromo P450 (CYP450) costituisce una superfamiglia di proteine coinvolte nel metabolismo degli xenobiotici, cui l'organismo è costantemente esposto. L'attività di metabolizzazione dei composti esogeni ed endogeni in molecole maggiormente idrofiliche e quindi più facilmente eliminabili, si associa alla bioattivazione di composti pre-mutageni o pre-cancerogeni. E' noto, infatti, come l'espressione del CYP sia aumentata in svariate forme tumorali umane (Bruno R.D. et al., 2007).

L'inibizione dell'espressione genica di diverse isoforme del CYP450, così come una sua inattivazione a livello catalitico, unita ad un potenziamento degli enzimi post ossidativi (fase II), come la GST, UDP-glucuronosil transferasi, acetiltransferasi, e sulfotransferasi, è stata considerata un valida strategia chemiopreventiva (Sapone A. et al., 2012). Inoltre, il crescente numero di evidenze scientifiche, che da un lato, associano ad un regolare consumo di frutta e verdura, una minore incidenza di cancro (Orenstein L. et al., 2016), dall'altro, mostrano come numerosi composti di origine vegetale, siano in grado di agire come induttori degli enzimi di fase II o come inibitori degli enzimi a funzione ossidativa di fase I, ha rafforzato l'interesse della comunità scientifica e incoraggiato diversi studi allo scopo di indagare la capacità di diversi vegetali o sostanze da essi derivate, come possibili agenti chemiopreventivi, capaci di esplicare la propria funzione, attraverso un meccanismo di "manipolazione enzimatica".nei confronti della teoria chemiopreventiva basata sulla manipolazione enzimatica (Sapone A. et al., 2012).

Incrementando la capacità metabolica degli enzimi di fase II, si otterrebbe una più rapida escrezioni di sostanze mutagene o cancerogene, costituendo una via di protezione a livello cellulare. Particolare attenzione è stata rivolta ad alcuni vegetali

appartenenti alla famiglia delle *Brassicaceae*, che contengono alti livelli di isotiocianati (Herr I. et al., 2010) che sono dei noti induttori degli enzimi di fase II (Steinkellner H. et al., 2001).

Essendo gli enzimi di fase-I responsabili della formazione di intermedi elettrofilici e radicali liberi, tali specie possono avere come bersaglio elementi nucleofili come le basi puriniche e pirimidiniche degli acidi nucleici, i residui di cisteina a livello proteico, e il glutathione (Klassen D. 2001). L'inibizione degli enzimi ossidativi, può limitare gli eventi di rottura o intercalazione a livello di DNA o RNA, nonché la riduzione della perossidazione lipidica e la formazione di ponti disolfuro a livello delle proteine (Badal S. et al., 2013).

1.1.6. Limiti della teoria chemiopreventiva classica

E' stato dimostrato come l'aumento del metabolismo di fase-II, è coinvolto nella formazione di specie elettrofile, e deve essere quindi considerato un "sistema bioattivante" per determinate specie chimiche, come gli idrocarburi alogenati o gli idrocarburi policiclici aromatici rispettivamente attivati da GST e sulfotransferasi (Guengerich F.P. et al., 1985; Glatt H. et al., 2001).

E' necessario dunque considerare che se da un lato l'incremento del potere detossificante si traduce in un effetto chemiopreventivo, accelerando l'escrezione di molecole pro-mutagene, dall'altro, si aumenterà la bioattivazione di altre sostanze a cui l'uomo è costantemente esposto. Se si considera che la popolazione è quotidianamente in contatto con molecole potenzialmente pericolose, si può ben comprendere come significative modulazioni del metabolismo potrebbero portare a effetti tossici imprevedibili (Cantelli-Forti G. et al., 1998).

Gli isotiocianti, che come sopracitato agiscono come induttori degli enzimi coniugativi, hanno mostrato effetti genotossici e sembrano agire come promuoventi della cancerogenesi a livello di fegato e vescica (Hirose M. et al., 1998; Gamet-Payrastre L. et al., 2000).

Considerazioni analoghe possono essere formulate per quanto riguarda l'inibizione degli enzimi ossidativi, ad esempio attraverso l'assunzione di fitoderivati come le catechine che riducono la formazione di nitrosamine (Yang C.S. et al., 1996), o i flavonoidi che riducono l'attivazione dell'aflatossina B1 da parte del CYP3A4 (Guengerich F.P. et al., 1990).

Le strategie chemiopreventive basate sulla "manipolazione" enzimatica, sembrerebbero trascurare il ruolo chiave degli enzimi di fase I, principalmente rappresentati dalla superfamiglia del CYP, che è quello di promuovere la detossificazione degli xenobiotici.

Inoltre inibitori di una o più isoforme del CYP possono essere al contempo degli induttori per altre isoforme. E' il caso del fenetil isotiocianato contenuto nella brassicaceae o del sulfuro diallie estratto dall'aglio, che sono inibitori del CYP2E1, ma inducono il CYP2B1 e il CYP1A2 (Yang C.S. et al., 1996).

E' inoltre importante tener conto del ruolo dei polimorfismi genetici che determinano l'esistenza di quello che viene chiamato "Individual metabolic fingerprint". L'esistenza nella popolazione di individui che possono essere considerati come "alti" o "bassi" metabolizzatori complica notevolmente il quadro.

1.1.7. Chemioprevenzione: stato dell'arte

Se la chemioprevenzione, nella sua accezione più ampia, si basa sull'utilizzo di alcuni elementi (farmaci, micronutrienti, fitoprodotti, o alimenti nel loro complesso), allo scopo di ridurre l'incidenza di alcune patologie, in determinati individui a rischio, e di migliorare lo stato generale di salute nella popolazione generale; è facile intuire come il successo di una simile strategia è direttamente legato ad una profonda conoscenza del meccanismo patogenetico della malattia in oggetto, unito ad una attenta valutazione dei fattori di rischio individuali. Nel caso delle malattie cardiovascolari, le suddette assunzioni, sono state in larga parte rispettate.

Quando la chemioprevenzione è applicata al cancro, risulta estremamente difficile individuare con sufficiente accuratezza i soggetti a rischio, e ancora più complesso è attribuire a tale rischio un grado di valutazione. Nonostante diversi studi di base e trial clinici abbiano identificato alcuni composti promettenti, numerose teorie e modelli interpretativi differenti, e spesso, in contrasto tra loro, sono stati proposti per il complesso processo della cancerogenesi, ma ad oggi non è ancora chiaro (ad eccezione di alcune note patologie genetiche) quali siano le cause principali della patologia tumorale (Vineis P. et al., 2010).

1.1.8. Frutta e verdura

Un regolare consumo di frutta e verdura è associato ad una riduzione del rischio di cancro, in particolar modo delle forme tumorali di origine epiteliale, per tale motivo, una alimentazione ricca in frutta e verdura è stata raccomandata come strategia per migliorare lo stato di salute della popolazione. Il programma di educazione alimentare *5 a day for a better health* lanciato negli USA a partire dal 1991, rappresenta un

esempio di quanto sopra citato. Il programma aveva come scopo incrementare il consumo di frutta e verdura ad almeno cinque porzioni quotidiane (Reynolds T. 1991; Heimendinger J. et al., 1996). Iniziato a livello locale nel 1988 in California, in 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 S.B. et al., 1995). Sull'onda di questo successo è poi divenuto un programma a carattere nazionale a partire dal 1991.

Tuttavia, ad oggi, in letteratura scientifica insieme a studi che promuovono fortemente il consumo di frutta e verdura come possibile strategia chemiopreventiva diretta principalmente contro le malattie cardiovascolari e il cancro (Wang X. et al., 2014), compaiono studi come l'European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) che mostra al contrario una associazione inversa tra il consumo di frutta e incidenza di cancro allo stomaco, così come viene riportato un aumento del rischio (anche se *bordeline*) legato al tumore mammario (Bradbury K.E. et al., 2014).

1.1.9. β -carotene

Il Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial (CARET) ha sorprendentemente rilevato un aumento del 28% di incidenza del tumore al polmone e un rischio più elevato per eventi cardiovascolari (Omenn G.S. et al., 1996), confermando i risultati dell'Alpha-Tocopherol and Beta-Carotene (ATBC) trial, che rilevò un aumento di circa il 18% dei casi di tumore nel braccio di intervento che ricevette il β -carotene (ATBC Cancer Prevention Study Group, 1994).

Fu proposta come possibile spiegazione ai risultati negativi di questi due importanti studi, la possibilità che il β -carotene abbia potuto abbassare lo stato ossidativo in alcuni tessuti al punto da inibire completamente l'effetto pro-apoptotico che le specie

reattive dell'ossigeno esercitano sulle cellule mutate, favorendone la proliferazione (Potter J.D. et al., 1996).

1.1.10. Vitamina C e vitamina E

Il Physicians Health Study II (PHSII) non mostrò effetti benefici significativi per patologie cardiovascolari, così come, non fu registrato alcun calo dell'incidenza di tumori al polmone o al colon, dopo intervento con vitamina E o C; inoltre, la vitamina E fu associata con un aumentato rischio per infarto emorragico (Gaziano J.M. et al., 2008; Sesso H.D. et al., 2008).

Lo studio di coorte Vitamins And Lifestyle (VITAL), al contrario non denotò alcun rischio associato al consumo di Vitamina E, suggerendo possibili effetti benefici nei confronti di alcune patologie croniche (Peters U. et al., 2008), mentre il Women's Antioxidant Cardiovascular Study concluse che non l'integrazione con Vitamina E o C non ha effetti significativi sull'incidenza di cancro, così come sulla mortalità (Lin J. et al., 2009).

Contrariamente a ciò che emerse dai risultati del Physicians Health Study II (PHSII), gli autori dell'ATBC study, osservarono una riduzione importante (circa il 34%) del tumore alla prostata, fu osservata nei pazienti che assunsero Vitamina E (Heinonen O.P et al., 1998).

Le evidenze contrastanti sul ruolo chemiopreventivo della Vitamina E, incoraggiarono il lancio dello studio SELECT, che ebbe come scopo principale quello di determinare se la Vitamina E somministrata singolarmente o in combinazione con il selenio, avesse un ruolo chemiopreventivo sul tumore alla prostata, in pazienti sani al momento dell'arruolamento. Dopo circa 5.5 anni di intervento si registrò un rischio pressoché nullo per il tumore alla prostata (Lippman S. et al., 2009), tuttavia, un

follow-up successive mostrò un aumento del 17% del rischio di cancro alla prostata nel braccio d'intervento a cui fu assegnato il trattamento con la sola Vitamina E (Klein E.A. et al., 2011).

I composti e gli alimenti sopracitati, a lungo sono stati considerati promettenti agenti chemioterapici, e molte delle aspettative che furono riposte in essi, si sono basate sulla loro indiscussa capacità antiossidante, largamente documentata da studi *in vitro* ed *in vivo*. I risultati degli studi sull'uomo hanno invece evidenziato un comportamento per lo più neutro di questi elementi, e in altri casi, è stato sorprendentemente osservato un aumento dell'incidenza di alcune patologie verso le quali era stata ipotizzato un effetto protettivo del composto in esame.

E' stato ipotizzato come molti dei fallimenti legati a queste strategie chemiopreventive su popolazione generale, risiedano nella grande diversità per fattori di rischio genetici, ambientali o età correlati, che intervengono quando si conducono studi multicentrici su grandi campioni (Potter J.D. et al., 2014). Un secondo aspetto, consiste nella scelta frequente di utilizzare un singolo agente. Così come in chemioterapia si utilizzano diversi farmaci allo scopo di evitare, o di contenere il più possibile la selezione clonale, per le stesse ragioni, l'utilizzo di un singolo agente chemiopreventivo potrebbe non essere una strategia vincente (Psaty B.M. et al., 2006).

1.2. Stress ossidativo radicali e cancro

1.2.1. Generalità

I radicali liberi sono specie chimiche aventi un elettrone spaiato sull'orbitale più esterno, ciò rende la molecola instabile, quindi reattiva. Per natura quindi, una molecola radicalica, dovrà acquisire un elettrone sottraendolo alle specie chimiche con cui viene in contatto, le quali a loro volta diventeranno instabili. I principali processi endocellulari che contribuiscono alla formazione di specie reattive sono:

- La respirazione aerobia che porta alla riduzione dell'ossigeno molecolare ad acqua.
- L'attivazione dei macrofagi con conseguente consumo di ossigeno e produzione di ossido nitrico, superossido, ipoclorito e perossido di idrogeno.
- L'attività degli enzimi a funzione monoossigenasica mista (P450).
- Il fenomeno di riperfusione ematica a livello dei tessuti coinvolti in eventi ischemici.

Ai processi cellulari sopraelencati, si devono sommare le cause ambientali che contribuiscono in maniera importante alla formazione di specie reattive incentrate sull'ossigeno, come ad esempio, l'esposizione a radiazioni ultraviolette o di natura ionizzante e l'inquinamento ambientale. Anche l'assunzione di alcuni farmaci o

l'abitudine al fumo di sigaretta, possono influenzare significativamente l'equilibrio "redox" dell'organismo.

I ROS possono reagire e compromettere o alterare il funzionamento di diverse strutture cellulari. Il plasmalemma, formato da un doppio strato fosfolipidico, è ricco di acidi grassi polinsaturi che gli conferiscono precise caratteristiche di permeabilità e fluidità. La reazione di perossidazione lipidica innescata dai ROS, porta alla formazione di perossidi ed idroperossidi che, aumentando la permeabilità della membrana plasmatica, alterano la funzione fisiologica della stessa, compromettendo la corretta esposizione di recettori, antigeni, così come l'attività degli enzimi di membrana (Halliwell B., 1999).

A livello proteico, è noto come i ROS causino l'alterazione della struttura proteica, ossidando i residui amminoacidici delle catene laterali o la formazione di legami crociati tra proteine (Berliner J.A. et al., 1994). Spesso si assiste a fenomeni di precipitazione proteica, denaturazione, aggregazione o degradazione da proteasoma.

Le giunzioni cellulari rappresentano un ulteriore bersaglio dei ROS, è ben noto come H_2O_2 inibisce la comunicazione cellulare mediata da *gap-junction* favorendo l'espansione clonale (Upham B.L. et al., 1997). Infine, alti livelli di ROS sono associati ad eventi di danno al DNA aumentando il rischio di mutagenesi (Halliwell B. et al., 1999).

1.2.2. Ruolo dei ROS nella cancerogenesi

Negli ultimi anni numerosi studi sono stati condotti allo scopo di comprendere meglio il rapporto tra le specie reattive incentrate sull'ossigeno (ROS) e l'incidenza di numerose patologie croniche come diabete, obesità e cancro (Reuter S. et al., 2010; Maiese K., 2015). La complessità della relazione che intercorre tra ROS e cancro è principalmente dovuta alla numerosità di specie reattive e alle loro differenti proprietà in termini di natura chimica, vita media, reattività, capacità di diffondere attraverso i compartimenti subcellulari, e non per ultimo, la loro potenzialità nel indurre modificazioni a livello di processi cellulari chiave (Briehl M.M., 2015).

La patogenesi del cancro è un processo multifasico, in cui di numerosi geni e pathway contribuiscono alla comparsa del fenotipo maligno. Nella fase iniziale, la massa tumorale si accresce alla presenza di insufficienti quantità di ossigeno, dovuta principalmente alla scarsa angiogenesi. Anche se il meccanismo che lega l'ipossia ad una maggiore produzione di ROS è ancora materia di discussione, alcune evidenze sembrano indicare che la scarsa quantità di ossigeno potrebbe alterare la catena di trasporto di elettroni a livello dei mitocondri, e generare ROS agendo sui complessi I, II e III; è stato infatti dimostrato come inibitori di ciascuno dei suddetti complessi, causi una riduzione significativa dei ROS rilasciati (Keith B. et al., 2007; Kondoh M. et al., 2013). L'aumento dei ROS indotti dall'ipossia sembra causare la stabilizzazione del fattore di trascrizione HIF che è massivamente coinvolto nella progressione tumorale (Hanahan D. et al., 2011). Quando il delicato equilibrio tra la produzione di ROS e l'azione di contrasto ad opera dei sistemi antiossidanti viene perduto, il DNA può essere soggetto a diversi insulti, che, se non riparati correttamente, possono innescare il processo di apoptosi, oppure, risultare in una mutazione, con conseguente perdita del controllo del ciclo cellulare (Okoh V.O. et al.,

2015). Un secondo importante contributo al processo di cancerogenesi, è dato dalla spinta che i ROS possono dare alla crescita tumorale, nonché all'instabilità genetica delle cellule trasformate. Molti tumori presentano una sovra-espressione degli oncogeni Myc e Ras, che determinano una riprogrammazione metabolica della cellula, quindi un aumento del metabolismo del glucosio con conseguente aumento dei ROS (Tafani M. et al., 2016). La crescita iniziale della massa tumorale può avvenire in assenza di angiogenesi, quando il diametro raggiunge i 200 μm (il limite della diffusione passiva dell'ossigeno dal sangue), il tumore si trova in uno stato di ipossia che determina importanti effetti sul metabolismo cellulare che diviene maggiormente dipendente dalla via glicolitica (Gatenby R.A. et al., 2004). Come descritto precedentemente lo stato di ipossia, e i conseguenti mutamenti metabolici portano ad un aumento dei ROS che a loro volta innescano l'espressione del fattore HIF mediante l'inattivazione del suo inibitore PHD. Una volta attivato HIF porta all'espressione di centinaia di geni tra cui quelli della VEGF, che sono responsabili della neo-angiogenesi, e quindi dell'espansione della massa oltre certi limiti, l'attivazione della telomerasi che aumenta il potenziale proliferativo, ed infine, i geni ADA PGK e GLUT-1, responsabili della transizione metabolica verso la via glicolitica (Tafani M. et al., 2016). La presenza di ROS nel microambiente tumorale è stata anche associata ad una maggior resistenza ai trattamenti chemioterapici, in particolare è stato osservato come l'aumento di HIF e/o la presenza di determinati livelli di ROS causino una aumentata espressione dei trasportatori ABC (Maugeri-Saccà M. et al., 2011). Inoltre, è stato dimostrato come i ROS attivino il reclutamento di diverse proteine actino-dipendenti che sono indispensabili per la formazione degli invadopodi, contribuendo a conferire al tumore caratteristiche di malignità (Tochhawng L. et al., 2013).

1.2.3. Antiossidanti

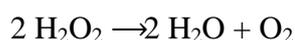
La cellula eucariote presenta un complesso sistema di difesa contro lo stress ossidativo che prevede sistemi enzimatici e molecole che sono in grado di agire come trappole chimiche per le specie radicaliche come molte vitamine, il GSH, coenzimi e polifenoli. Gli antiossidanti manifestano la loro azione contrastando o impedendo l'ossidazione di lipidi, proteine, o acidi nucleici, che rappresentano gli elementi fondamentali delle macrostrutture cellulari, o, come nel caso di DNA ed RNA, il mezzo con cui l'informazione genetica viene conservata e trasferita. Tra questi vi sono gli enzimi antiossidanti che catalizzano la trasformazione o la distruzione di ROS, le molecole chelanti, e molecole in grado di agire da *scavenger*, come molte vitamine, il GSH, coenzimi e polifenoli. Il glutatione (GSH) rappresenta uno dei principali antiossidanti solubile, presente in grandi quantità nella cellula, il suo gruppo -SH del residuo cisteinico gli conferisce la capacità di cedere un elettrone. La reazione porta alla formazione di un radicale tiile (GS•) che normalmente dimerizza originando la forma ossidata del GSH (GSSG). I livelli di GSH vengono garantiti alla cellula tramite l'attività dell'enzima GSH reduttasi NADPH dipendente. In condizioni di omeostasi, la concentrazione di GSH risulta essere molto superiore rispetto a quella di GSSG; la valutazione del rapporto GSH/GSSG, viene infatti incluso in molti test cellulari, allo scopo di valutare l'equilibrio redox. Il GSH oltre che ad avere una buona attività come *scavenger* nei confronti del radicale idrossile, è coinvolto in numerosi processi cellulari ed è utilizzato da alcuni sistemi enzimatici detossificanti (glutatione perossidasi, glutatione transferasi) come cofattore (Valko M. et al., 2006). Ubichinone (CoQ₁₀), è considerato l'unico antiossidante lipofilo ad essere sintetizzato a livello cellulare. Strutturalmente molto simile alla vitamina E, presenta un benzochinone legato ad una catena isoprenica. Ha ruolo fondamentale nel prevenire il

fenomeno di perossidazione lipidica a livello delle membrane cellulari, ed è fondamentale per la sua funzione ripristinare lo stato ridotto di altre molecole antiossidanti come la vitamina C ed E. Insieme alla vitamina E costituisce il sistema maggiormente impiegato dalla cellula per difendere i lipidi di membrana. Entrambi sono in grado di agire come scavenger, interrompendo la reazione di perossidazione lipidica, o come quencher inattivando l'ossigeno singoletto.

Numerose molecole di origine vegetale introdotte con la dieta, possono costituire una risorsa antiossidante fondamentale. E' il caso dei carotenoidi, o dei polifenoli che possono agire come antiossidanti diretti o indiretti. Numerosi studi mostrano come numerosi composti antiossidanti di origine vegetale, possano agire come induttori dell'espressione di alcuni enzimi antiossidanti o di fase II (Carratù B. et al., 2005).

1.2.4. Principali sistemi antiossidanti enzimatici

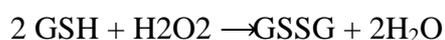
Localizzata principalmente a livello del citoplasma, la catalasi (CAT), ha la capacità di decomporre il perossido di idrogeno H_2O_2 ad ossigeno molecolare ed acqua



La glutatione perossidasi (GSH-Px) agisce principalmente a livello intracellulare, bloccando il danno da perossidi tramite una reazione che li riduce ad acqua e alcool con l'ossidazione del glutatione:



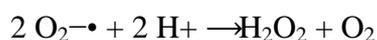
La glutatione perossidasi è, inoltre, in grado, ossidando il GSH, di convertire l' H_2O_2 a 2 molecole di acqua:



La glutatione reduttasi (GSSG-Red) NADPH-dipendente ha il ruolo di ridurre il GSSG ripristinando i livelli di GSH secondo la reazione:

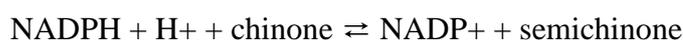


La superossido dismutasi (SOD) è un metallo-enzima che catalizza la dismutazione dello ione superossido ad ossigeno molecolare e perossido di idrogeno (Valko et al. 2007), secondo la seguente reazione:



A pH fisiologico la velocità di dismutazione in presenza di SOD, è maggiore rispetto a quella non enzimatica, di circa 1000 volte.

La NADP(H): chinone ossidoreduttasi 1 (NQO1), un enzima appartenente alla classe delle ossidoreduttasi, che catalizza la seguente reazione:



I chinoni sono un gruppo di substrati molto comuni, che sono ridotti con un meccanismo di trasferimento di ioni idruro per generare il corrispondente derivato idrochinonico. La NQO1 ha inoltre un importante ruolo nel metabolismo dei chinoni endogeni come la vitamina E e l'ubichinone, rigenerando l'ubichinolo o generando l'idrochinone corrispondente nel caso dell'attacco della vitamina E ad un radicale. Per esempio la riduzione dell'ubichinone ad opera della NQO1 rigenera l'ubichinolo, che possiede forti proprietà antiossidanti, oppure la riduzione del chinone vitamina E, che

si forma durante l'attacco del radicale libero alla vitamina E (Kohar I. et al. 1995; Landi L. et al. 1997).

1.2.5. Attività chemiopreventiva degli antiossidanti naturali: gli studi clinici

Già negli anni immediatamente successivi all'introduzione del termine chemio prevenzione da parte di Michael Sporn, numerosi studi furono condotti allo scopo di individuare le proprietà antitumorali di alcuni alimenti o di composti chimici da essi derivati (Yang C.S. et al., 2016). Il razionale che per molti anni alimentò la ricerca in questo campo, si basava sulla facilità di recuperare facilmente i composti di interesse, essendo essi contenuti abbondantemente in alimenti comuni spesso di origine vegetale. A quest'aspetto, si univa la credenza che tali sostanze, essendo di origine naturale, presentassero una bassa tossicità. Durante le ultime decadi, diversi studi hanno riportato risultati interessanti sull'impiego di fitocomposti, molti dei quali noti per le loro proprietà antiossidanti, come possibili agenti chemiopreventivi o chemioterapici. Tuttavia, solo un numero ristretto di tali sostanze, hanno confermato il loro potenziale benefico nei trial clinici (Yang C.S. et al., 2016).

Nel 1980 un forte interesse da parte della comunità scientifica fu diretto al β -carotene, per le sue ottime proprietà antiossidanti. Il Finnish smokers in the α -Tocopherol and β -Carotene (ATBC) study, fu lanciato nel 1985, con lo scopo principale di studiare gli effetti del β -carotene sull'incidenza di tumore al polmone in soggetti fumatori (The ATBC study group, 1994). Furono arruolati 29 133 fumatori di sesso maschile di età compresa tra i 50 e i 69, il follow-up ebbe una durata media di 4.5 anni. Degli 876 casi di tumore al polmone registrati, non fu osservata nessuna riduzione statisticamente rilevante nei pazienti che ricevettero α -tocoferolo, mentre, inaspettatamente, il gruppo a cui fu somministrato il β -carotene, riportò un aumento

dell'incidenza di tumore al polmone di circa il 18%. Lo studio evidenziò tuttavia, una riduzione dei tumori alla prostata di circa il 45% nel gruppo di pazienti assegnati al trattamento con α -tocoferolo (Heinonen O.P. et al., 1998).

Lo studio β -Carotene and Retinol Efficacy Trial (CARET), fu condotto su un campione notevolmente più ampio, 18 314 fumatori e lavoratori esposti ad asbesto furono trattati con una combinazione di 30 mg di β -carotene e 25 000 IU di vitamina A (Omen G.S. et al., 1996). Anche in questo caso fu riportato un aumento dell'incidenza di cancro e patologie cardiovascolari.

Il Nutritional Prevention of Cancer Study (NPC), fu condotto con lo scopo di indagare le potenzialità chemiopreventive del selenio principalmente nei confronti dei tumori cutanei. A 1312 pazienti con pregresso riscontro di tumori epiteliali, fu somministrato 200 μ g di selenio, e il follow-up ebbe una durata media di 6.4 anni. Lo studio non mise in luce alcun effetto significativo del selenio, su l'incidenza di tumori cutanei, tuttavia, gli endpoint secondari dello studio, rilevarono come il selenio, diminuiva la mortalità per patologie tumorali, e più precisamente, fu riportata un calo significativo dei tumori al polmone, colon, e prostata (Clark L.C. et al., 1996).

In contrasto con lo studio NPC, il Vitamins And Lifestyle (VITAL) prospective cohort study, non rilevò nessun effetto significativo del selenio sui tumori prostatici, ma ne osservò una riduzione nell'incidenza, in pazienti che assumevano grandi quantità di vitamina E (Peters U. et al., 2008).

1.2.6. Studi sul ruolo chemiopreventivo del tocoferolo

Recentemente le proprietà chemiopreventive del tocoferolo (α -tocoferolo e γ -tocoferolo), sono state studiate attraverso due trial clinici (CLUE II e Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer (PLCO) Screening Trial), evidenziando come alti livelli plasmatici di α -tocoferolo o γ -tocoferolo, siano associati ad una minor incidenza di tumore alla prostata (Huang H.Y. et al., 2013; Weinstein S.J. et al., 2012). I dati sopracitati uniti ai risultati del ATBC study e del NPC Nutritional trial, incoraggiarono il lancio dello studio Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). Gli studi contò 35 000 pazienti di sesso maschile ai quali fu somministrato selenio (200 μ g) o α -tocoferolo (400 IU), singolarmente o in combinazione. Dopo un primo follow-up di 5.5 anni, non furono riportate differenze significative nell'incidenza di alcun tipo di tumore (Lippman S.M. et al., 2009). Tuttavia, la pubblicazione dei risultati al successivo follow-up (7-12 anni), rilevò sorprendentemente un aumento del 17% dell'incidenza di tumori prostatici nel gruppo trattato con α -tocoferolo (Klein E.A. et al., 2011). Lo studio riportò che i livelli di γ -tocoferolo, erano inferiori rispetto a quelli registrati al baseline, per i pazienti che ricevettero l' α -tocoferolo. Fu quindi ipotizzato che il calo della concentrazione plasmatica di γ -tocoferolo, che svolge una attività antiinfiammatoria ben documentata (Campbell S. et al., 2003; Ju J. et al., 2010), potesse essere una delle cause dei risultati ottenuti.

1.3. Vitamina E

1.3.1. Cenni storici

Scoperta per la prima volta da Herbert MC Lean Evans nel 1922, la vitamina E fu inizialmente identificata come un fattore liposolubile indispensabile per impedire la morte fetale in roditori. La struttura molecolare venne determinata da Erhard Fernholz nel 1938 a cui si deve anche il nome di tocoferolo.

La vitamina E rappresenta un gruppo di nutrienti antiossidanti rappresentato da tocoferoli e tocotrienoli. Il tocoferolo è caratterizzato da una struttura chimica costituita da un anello cromano e una coda laterale isoprenoide satura (insatura nel caso della struttura dei tocotrienoli). Al variare del numero e della posizione dei gruppi metilici sull'anello di cromano, si ottengono α -, β -, γ - e δ - tocoferolo o tocotrienolo.

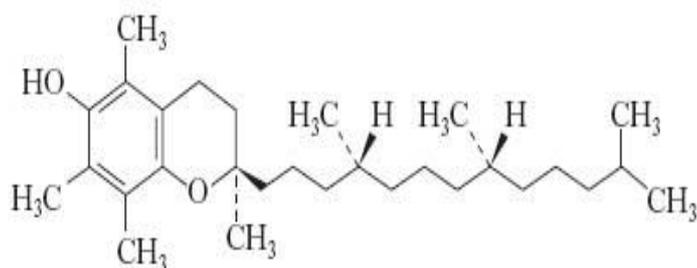


Figura 1.1. Struttura chimica della molecola di tocoferolo.

Le caratteristiche antiossidanti della vitamina E furono da subito oggetto di numerosi studi, in particolare, fu descritta la sua capacità di contrastare il fenomeno di perossidazione lipidica, donando un atomo di idrogeno ai radicali perossilipidici e rendendoli meno reattivi (Burton G.W. et al., 1986). La reazione produce un radicale

α -tocoferossilico, che risulta piuttosto stabile e che può reagire con la vitamina C, o con il glutatione, o con il coenzima Q10 per riformare l' α -tocoferolo.

Tale reazione redox trasforma la vitamina E in un radicale α -tocoferossilico che è piuttosto stabile, grazie allo sviluppo di fenomeni di risonanza, e che può reagire con la vitamina C, o con il glutatione, o con il coenzima Q10 per riformare l' α -tocoferolo.

L'attività antiossidante della vitamina E ha persuaso molti gruppi di ricercatori a indagare il suo ruolo benefico nella prevenzione di alcune patologie croniche, dove lo stress ossidativo ricopre un ruolo chiave nell'insorgenza o nella progressione della malattia come, ad esempio, le patologie cardiovascolari, l'aterosclerosi e il cancro.

1.3.2. Metabolismo e modulazione del CYP450

La vitamina E è assorbita nell'intestino ed entra nel sistema circolatorio attraverso la via del sistema linfatico. Assorbita assieme ai lipidi ed inclusa nei chilomicroni, viene accumulata nelle strutture membranose delle cellule (mitocondri, microsomi, membrane plasmatiche e nucleari).

A differenza del trasporto a livello del torrente circolatorio, che viene mediato da lipoproteine, l'assorbimento cellulare è mediato da proteine di trasporto come l' α -TTP. Espressa principalmente a livello epatico, l' α -TTP si ritrova a livelli inferiori in numerosi organi come retina, sistema nervoso centrale, rene, polmone milza e utero e placenta (Schmölz L. et al., 2016).

E' stato dimostrato come il trasportatore α -TTP, presenti una differente affinità per le varie forme di vitamina E, in particolare, l' α -tocoferolo, sembra legarsi più facilmente alla proteina (Hosomi A. et al., 1997).

E' interessante notare come la differente affinità per le diverse forme di vitamina E mostrata dalla α -TTP, rifletta l'attività biologica delle stesse. Alcuni autori hanno ipotizzato che la differenza nell'attività biologica potesse dipendere quindi dalla loro

capacità di essere assorbite (Schmolz L. et al., 2016). Tuttavia, un recente studio sembra indicare che il vero fattore discriminante possa essere il metabolismo della molecola. L' α -TTP potrebbe proteggere la catena laterale dalla reazione di ω -idrossilazione, impedendo la degradazione della stessa (Greibenstein N. et al., 2015).

Come precedentemente riportato, il metabolismo della vitamina E inizia con la reazione di ω -idrossilazione, differenti isoforme del CYP450 sembrano essere coinvolte nel metabolismo della vitamina E, anche se l'isoforma CYP3A4 e la CYP4F2 hanno riportato una maggiore attività. E' stato infatti dimostrato come esponendo una coltura di cellule epatiche (HepG2), ad un noto induttore dell'isoforma CYP3A4, come la rifampicina, si ottenevano livelli maggiori del metabolita carbossietil idrossicromano (CECH) derivante dall' α -tocoferolo (Birringer M. et al, 2001). Il metabolismo del γ -tocoferolo, tuttavia, sembrava non risentire dell'induzione del CYP3A4, i livelli di γ -CEHC a partire da γ -tocoferolo, non riportavano significative variazioni, suggerendo che il CYP3A4 non fosse coinvolto nella metabolizzazione di tutti gli isomeri della vitamina E.

In seguito, Sontag e collaboratori, dimostrarono come l'isoforma CYP4F2 esercitasse una spiccata attività metabolica nei confronti sia di γ - che α -tocoferolo (Sontag T.J. et al, 2002).

Diversi studi sono stati condotti allo scopo di studiare la capacità da parte della vitamina E di modulare l'espressione o l'attività enzimatica CYP450 dipendente.

Gli studi di Carpenter, mostrarono come ratti sottoposti ad un regime alimentare carente di vitamina E, presentavano una ridotta capacità metabolizzante, che poteva però essere ristabilita con l'integrazione di α -tocoferolo per 8-12 settimane. Inoltre, l'osservazione che l'effetto della vitamina E potesse essere inibito dalla somministrazione di actinomicina D, un noto inibitore a livello trascrizionale, suggerì

l'ipotesi che α -tocoferolo potesse agire come induttore del CYP450 attraverso un meccanismo mRNA dipendente (Carpenter M.P., 1972).

Successivi studi *in vitro* hanno confermato l'azione induttiva in particolare, da parte dell' α -tocoferolo e del γ -tocotrienolo sull'espressione genica delle isoforme CYP3A4 e CYP3A5 (Schmolz L. et al., 2016).

In uno studio condotto su topo, è stato dimostrato come la somministrazione di 200 mg di α -tocoferolo porti ad un aumento dell'espressione dell'mRNA dell'isoforma *cyp3a11*, l'omologo murino del CYP3A4. Tuttavia, la somministrazione di γ -tocotrienolo, non si tradusse in alcun cambiamento significativo nell'espressione genica (Kluth D. et al., 2005). Risultati analoghi furono ottenuti da Traber e colleghi (Traber M.G, 2010), che confermarono l'attività di modulazione a carico dell'espressione genica del *cyp3a* epatica in topi supplementati con α -tocoferolo. Questi risultati contrastanti, trovarono spiegazione nell'alto livello di metabolizzazione del γ -tocotrienolo, come dimostrato dalla marcata escrezione di γ -CEHC e dalla mancanza di un aumento della concentrazione plasmatica di γ -tocotrienolo. Fu ritenuto probabile che la rapida escrezione e il mancato accumulo di γ -tocotrienolo abbiano impedito l'attivazione genica.

Essendo il recettore nucleare PXR responsabile dell'induzione del CYP3A, furono condotti studi per comprendere i meccanismi molecolari responsabili del fenomeno di up-regulation vitamina E dipendente. Utilizzando un modello murino caratterizzato da *humanized-PXR*, *wild-type PXR* o *PXR-null*, si osservò come l'aumento dell'espressione del *Cyp3a11* epatico, così come molti altri CYP, si riscontrava solo nell'animale wild-type suggerendo una specie-specificità nell'attivazione di PXR da parte dell' α -tocoferolo (Johnson C.H. et al, 2012). Inoltre, gli esperimenti di *gene-expression* condotti sulla sottofamiglia 2C, evidenziò una sovraespressione delle

isofrome Cyp2c29, Cyp2c37, e Cyp2c55, indicando che il fenomeno d'induzione poteva essere anche indipendente dal recettore PXR (Johnson C.H. et al, 2012).

Aumenti significativi nell'espressione delle sottofamiglie cyp3a, 2b, 2c a livello epatico sono stati osservati in seguito a trattamento giornaliero con α -tocoferolo alla dose di 100 mg/100g per via sottocutanea (Mustacich D.J. et al., 2006).

1.4. Enzimi del metabolismo degli xenobiotici

1.4.1. Generalità

Gli xenobiotici rappresentano l'insieme di sostanze naturali o di sintesi, cui l'organismo è esposto, in maniera diretta o indiretta. Tali sostanze possono entrare in contatto con l'uomo attraverso l'ambiente, come ad esempio sostanze chimiche inquinanti, pesticidi, tossine, additivi alimentari o metaboliti di origine animale o vegetale, oppure possono essere assunte voluttuariamente, come i farmaci o altri composti a fine terapeutico.

Generalmente lipofili e privi di carica elettrica, gli xenobiotici vengono trasformati in prodotti più polari, maggiormente idrosolubili, e quindi più facilmente eliminabili.

Il sistema di enzimi coinvolti nel processo di detossificazione degli xenobiotici, viene spesso indicato come "sistema enzimatico del drug-metabolism". I processi biochimici che intervengono in tale processo, e i sistemi enzimatici che li permettono, sono frequentemente indicati con il termine fase I, fase II e fase III.

Le reazioni di fase I determinano lo smascheramento di un gruppo funzionale (-OH, -NH₂, SH) rendendo la molecola più polare. I prodotti della fase I possono essere coniugati ad un substrato endogeno come ad esempio l'acido glucuronico, il glutatione o amminoacidi, formando un composto altamente polare. Le reazioni di fase II comprendono il trasporto delle molecole a livello cellulare.

Il sistema enzimatico del metabolismo degli xenobiotici è inoltre coinvolto in diverse funzioni cellulari, come la sintesi e il metabolismo degli ormoni steroidei, prostaglandine, eicosanoidi, acidi grassi e colesterolo (Nebert D.W. et al., 1994).

Essendo il fegato la centrale metabolica dell'organismo, tali enzimi sono espressi in maggiore quantità a livello epatico, tuttavia, è importante tener presente

l'ubiquitariet  degli enzimi del drug-metabolism che sono presenti, anche in proporzioni molto differenti, in ciascun tessuto.

Anche a livello subcellulare, gli enzimi del metabolismo sono diffusi in diversi compartimenti cellulari, come il reticolo endoplasmatico, i mitocondri, il citoplasma, o i lisosomi.

La loro larga diffusione sia a livello sistemico o subcellulare, riflette la loro ampia capacit  di interagire con substrati di diverse forme, dimensioni e caratteristiche stereochimiche, caratteristica che li contraddistingue da altri enzimi che presentano una alta specificit  per un numero estremamente ridotto di composti. Tuttavia, il prodotto delle reazioni catalizzate risulta essere stereo e regiospecifico (Scott E.E. et al., 2003).

1.4.2. Enzimi di fase I

Le reazioni di fase I comprendono: ossidazioni, eossidazioni, riduzioni, idrolisi e dealogenazioni.

L'ossidazione rappresenta in termini quantitativi la reazione pi  importante, i sistemi enzimatici maggiormente coinvolti sono il sistema monoossigenasico citocromo P450-dipendente (ossidasi a funzione mista) e il sistema delle amminossidasi a funzione mista (flavin-monoossigenasi o FMO) (Guengerich F.P., 2006).

La reazione ossidativa rappresenta la fase iniziale del processo di biotrasformazione per molti composti. L'attivit  del sistema monoossigenasico richiede un agente riducente (NADPH) e l'ossigeno molecolare.

Una tipica reazione pu  essere sintetizzata nell'inserimento di un atomo di ossigeno all'interno del substrato, con conseguente riduzione dell'altro ad acqua.

Il citocromo P450 è una emoproteina che possiede come gruppo prostetico una ferriprotoporfirina inserita in una tasca idrofobica. L'atomo di ferro risulta essere pentacordinato con i quattro atomi di azoto della porfirina, mentre il quinto legando è un gruppo sulfidrilico (-SH)

In tale processo, il citocromo P450 ossidato (Fe^{3+}) si lega al substrato formando un complesso binario. L'enzima NADPH citocromo P450 reduttasi fornisce un elettrone riducendo il ferro del citocromo. L'ossigeno molecolare si lega al ferro, e a questo punto interviene il secondo elettrone donato dalla NADPH citocromo P450 reduttasi formando il complesso $\text{Fe}^{2+} - \text{O}_2$ in equilibrio con $\text{Fe}^{3+} - (\text{O}_2)^{-2}$. La reazione dell'ossigeno con 2H^+ generano una molecola di acqua e il complesso FeO^{3+} . L'ossigeno del complesso è altamente reattivo e sottrae al substrato un atomo di idrogeno formando un radicale, che reagendo con un gruppo -OH crea il prodotto (R-OH) che viene rilasciato in favore di una molecola di acqua (Lewis D.F. et al., 2003). Il ciclo catalitico del citocromo P450 costituisce una fonte di specie reattive dell'ossigeno (ROS) come l'anione superossido o il perossido di idrogeno, che a loro volta possono dare origini ad ulteriori radicali (Paolini M. et al., 1996).

1.4.3. Enzimi di fase II

I composti derivanti dalle reazioni di fase I se successivamente polari possono essere escreti direttamente, oppure possono subire una reazione di coniugazione con molecole endogene ad opera degli enzimi di fase II.

Una delle reazioni più comuni è la coniugazione con il glutatione che può avvenire spontaneamente o tramite l'azione della glutatione transferasi (GST).

La GST ha un ruolo importante di difesa verso i composti elettrofili reattivi e tossici come i ROS (Sheehan D. et al., 2001).

La glucuronazione, mediata dall'enzima UDP-glucuroniltransferasi (UDPGT) costituisce una delle reazioni di detossificazione più importanti nel metabolismo di quasi tutti i vertebrati (Jancova P. et al., 2010).

L'enzima catalizza la formazione del legame tra un nucleofilo e l'acido uridindifosfoglucuronico con conseguente formazione del prodotto glucuronato.

La coniugazione di 3'fosfoadenosina-5'fosfosolfato è catalizzata da una superfamiglia di enzimi chiamati sulfotransferasi (SULT). La reazione prevede la presenza di un gruppo accettore O-, N-, S- del substrato (Strott C.A. et al., 2002).

Gli enzimi N-acetiltransferasi (NAT) sono enzimi coinvolti principalmente nel metabolismo delle ammine aromatiche trasferendo il gruppo acetile dell'acido acetilcoenzima A al gruppo amminico del substrato.

Le reazioni di fase II sono classicamente considerate come il vero processo di detossificazione. Tuttavia, è noto dalla letteratura come numerose reazioni di fase II siano coinvolte nella generazione di specie elettrofile, assumendo il ruolo di sistema "bioattivante" per alcune classi di composti chimici come ad esempio gli idrocarburi alogenati o gli idrocarburi policiclici aromatici (Sapone A. et al., 2012).

L'azione bioattivante o detossificante da parte degli enzimi coinvolti nel processo di metabolizzazione degli xenobiotici dipende unicamente dalla natura del substrato e non dal sistema enzimatico coinvolto.

1.4.4. Enzimi di fase III

Le reazioni di fase III comprendono il trasporto extracellulare ad opera di proteine transmembrana ATP dipendenti. Tali proteine sono denominate ATP binding proteins, e comprendono la ben nota glicoproteina p (Pgp) che ha un ruolo fondamentale nel trasporto di composti lipofili a livello dell'intestino, della barriera ematoencefalica, ematotesticolare, del tubulo prossimale renale e del fegato. La sua sovraespressione è causa di farmacoresistenza in diverse patologie tumorali (Mizzuno N. et al., 2003).

Fanno parte delle reazioni di fase III anche l'idrolisi di glucuronidi da parte delle β -glucuronidasi, così come aromatizzazioni o riduzioni di composti ossidati ad opera degli enzimi di fase I.

1.4.5. Induzione degli enzimi del drug-metabolism e co-cancerogenesi

E' stato ampiamente dimostrato tramite studi *in vivo* o su tessuti di derivazione umana, come il macchinario enzimatico deputato al metabolismo degli xenobiotici possa essere modulato (indotto o inattivato) da una grande quantità di molecole a cui l'uomo è esposto quotidianamente, comprese quelle derivanti da alimenti di origine animale e vegetale (Graham M.J. et al., 2008).

In questo paragrafo sarà considerato il fenomeno dell'induzione del citocromo P450 (CYP450), e la sua relazione con la cancerogenesi.

1.4.6. Principali meccanismi d'induzione del CYP450

Molte isoforme del CYP450 sono indotte attraverso un aumento della trascrizione del gene mediata da recettore. I principali recettori nucleari coinvolti nell'induzione delle sottofamiglie CYP1A, CYP2B, CYP3A e CYP4A comprendono il recettore per gli idrocarburi arilici (AhR), il recettore costitutivo per l'androstano (CAR), il recettore X per il pregnano (PXR) e il recettore per il proliferatore attivato dei perossisomi (PPAR) (Lin J.H., 1998).

Il recettore AhR è attivato dal legame con il ligando, viene reclutato il traslocatore nucleare (Arnt), quindi il legame con la sequenza di DNA che identifica l'elemento di risposta ("DNA response element"). Studi su topi knock-out per il gene codificante per il recettore AhR, hanno dimostrato come l'induzione dell'isoforma CYP1A2 possa avvenire tramite un meccanismo indipendente da AhR, probabilmente coinvolgendo dei processi post-traduzionali che portano ad una stabilizzazione della proteina (Graham M.J. et al., 2008).

A differenza di AhR, i recettori CAR, PXR e PPAR creano un eterodimero con il recettore X per i retinoidi (RXR). Inoltre, l'induzione mediata da CAR può avvenire anche senza legame diretto con l'induttore, è stato dimostrato come, l'induzione da fenobarbitale, avviene grazie ad una defosforilazione della serina 202, che a sua volta attiva la traslocazione del recettore nel nucleo (Yoshinari K. et al., 2008).

L'attivazione di CAR e di PPAR attiva una risposta di tipo pleiotropico più ampia che coinvolge l'espressione di numerosi geni codificanti per enzimi di fase I e II, portando a significative modificazioni del profilo metabolico basale. Per tale ragione, il fenomeno di induzione del CYP450, non può essere considerato solo nell'ambito del metabolismo degli xenobiotici, al contrario, rappresenta un vero e proprio marcatore dell'attività trascrizionale della cellula (Graham M.J. et al., 2008).

Diversi studi hanno dimostrato che esistono marcate differenze interindividuali del contenuto epatico di CYP450, nonché dell'inducibilità di tale sistema enzimatico (Tang C, et al., 2005). Inoltre, numerose evidenze indicano come l'induzione sia un fenomeno altamente specie-specifico. La somministrazione di omeprazolo produce effetti induttivi delle sottofamiglia CYP1A1 ma ha un effetto molto modesto su ratto, topo o coniglio. Il TCDD esercita un effetto induttivo su CYP1A in ratto, mentre su epatociti umani si osserva una azione principalmente rivolta verso l'isoforma sottofamiglia CYP1A2 (Xu L. et al., 2000).

1.4.7. Aspetti clinici dell'induzione del CYP450

Frequentemente si osserva che alcune sostanze o farmaci sono induttori di quelle isoforme da cui essi stessi vengono metabolizzati. Questo porta ad una più rapida metabolizzazione ed escrezione, e, nel caso di un farmaco, ad un minor effetto farmacologico. Al contrario, un pro-farmaco verrebbe attivato maggiormente con un aumento degli effetti terapeutici o di quelli avversi (Graham M.J. et al., 2008).

Una importante conseguenza a livello clinico dell'induzione del CYP450 si verifica quando l'induzione del drug-metabolism causata da un farmaco, o da composto a cui il paziente è esposto, accelera il metabolismo di un secondo farmaco, annullandone gli effetti terapeutici (Dickins M. et al., 2004). La rifampicina per esempio è un potente induttore di diverse isoforme epatiche del CYP450 quali la CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 e CYP3A4; la somministrazione di rifampicina è stata associata a numerosi episodi di interazioni farmacologiche, in quanto aumenta il metabolismo e di conseguenza diminuisce i livelli plasmatici di svariati farmaci come gli inibitori delle proteasi utilizzati nel trattamento dell'AIDS, gli anticoncezionali orali, o il warfarin (Dickins M. et al., 2004).

Negli ultimi anni numerosi studi hanno dimostrato l'associazione tra l'induzione del CYP450 e la cancerogenesi. In particolare, è noto come induttori non-genotossici aumentino l'insorgenza di tumori in diversi modelli animali. Ad esempio studi recenti hanno mostrato come l'induzione della sottofamiglia CYP2B produca effetti cancerogeni in fegato e tiroide, mentre gli induttori del CYP4A sono stati associati a tumori pancreatici, e patici e testicolari (Holsapple M.P. et al., 2006).

Il fenomeno dell'induzione non può essere ristretto ai soli effetti dipendenti dall'aumento dell'attività dell'isoforma coinvolta. Ad esempio l'induzione del CYP2B da parte del fenobarbitone è associata anche ad una maggior espressione di alcuni enzimi di fase II come la GST, UDPGT e SULT; altri composti non genotossici hanno riportato la capacità di interferire con l'espressione genica di numerosi geni coinvolti in processi chiave come la proliferazione cellulare, l'apoptosi e il metabolismo energetico (Huang W. et al., 2005).

La cancerogenesi mediata dall'induzione del sistema monoossigenasico è stata oggetto di studio negli ultimi anni da parte dell'International Programme on Chemical Safety. Gli studi hanno indentificato un alto numero di cancerogeni non-genotossici che agirebbero secondo un meccanismo CYP450 dipendente, attraverso l'attivazione di recettori nucleari tra cui CAR e PPAR (Holsapple M.P. et al., 2006).

E' importante ricordare l'attività del CYP450 è strettamente connessa al metabolismo degli ormoni steroidei come il 17 β -estradiolo e la melatonina (Badal S. et al., 2013). L'espressione della famiglia CYP1 è regolata in diversi tumori dall'estradiolo, nel cancro della mammella, l'isoforma CYP1B1 è indotta da parte dell'estradiolo, che a sua volta è metabolizzato dal CYP1B1 stesso a estradiol-3,4,-chinone, un potenziale cancerogeno (Go R. et al., 2015).

Si può concludere che il fenomeno di induzione si traduce in una accelerazione del metabolismo che porta ad una serie di eventi che possono essere connessi al fenomeno di cancerogenesi direttamente o indirettamente. Un aumento dell'attività catalitica delle monoossigenasi causerà inevitabilmente una aumentata bioattivazione di molecole che pretossiche, premutagene, precancerogene. Inoltre, durante il proprio processo catalitico, come descritto precedentemente, il CYP450, in seguito a dissociazione del complesso $P450-Fe^{3+}-O_2^-$ si verifica la liberazione dello ione radicale superossido che da luogo ad ulteriori forme reattive ad esso associate come il radicale idrossilico, l'ossigeno singoletto o il perossido di idrogeno.

L'induzione del CYP450, si associa ad un aumento della concentrazione di ROS a livello tissutale. Tale fenomeno, essendo strettamente al ciclo catalitico del CYP450, è indipendente dall'isoforma indotta, così come dal composto che l'ha causata. La tossicità dei ROS come discusso precedentemente si esplica con l'interazione di essi con lipidi, proteine e macromolecole come il DNA, da cui possono derivare alterazioni che possono interferire positivamente con il processo di cancerogenesi (Paolini M. et al., 1996).

2. Scopo del progetto di ricerca

La vitamina E (VE) è da sempre stata considerata un composto sicuro, e la sua assunzione come integratore alimentare, è associata ad effetti benefici per la salute (Hathcock J.N. et al., 2005). Le sue eccellenti proprietà come antiossidante, inoltre, hanno spinto la comunità scientifica a studiare il suo possibile impiego nel contrastare l'insorgenza, o migliorare il decorso di numerose patologie degenerative in cui lo stress ossidativo ha un importante ruolo eziologico, come le malattie cardiovascolari e il cancro (Stampfer M.J. et al., 1993; Huang H.Y. et al., 2003; Blum S. et al., 2010; Ju J. et al., 2010).

Negli ultimi decenni, la possibile associazione tra VE e la riduzione dell'incidenza delle patologie neoplastiche è stata indagata attraverso numerosi trial clinici. Tuttavia, i risultati si sono dimostrati ambigui e il suo impiego come agente chemiopreventivo su larga scala è oggi più che mai al centro del dibattito scientifico. The *Nutritional Prevention of Cancer (NPC) study* e l'*Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention (ATBC) study*, mostrarono una riduzione significativa dell'incidenza di cancro alla prostata in pazienti a cui fu somministrata la VE nella forma di α -tocoferolo. La combinazione di β -carotene e VE fu associata ad una riduzione sensibile dell'insorgenza di ciascuna forma di tumore maligno (Clarck L.C. et al., 1996; The ATBC Cancer Prevention Study Group, 1994). Tali risultati trovarono ulteriore conferma in studi epidemiologici (Taylor P.R. et al., 1998; Fleshner N. et al., 1999). Tuttavia, recenti studi e metanalisi sembrano non confermare i risultati positivi ottenuti con gli studi di intervento, limitandosi a concludere che un'integrazione di VE non si traduce in un effettivo beneficio per la salute del consumatore, ma al contempo, escludono possibili effetti tossici legati al suo regolare utilizzo

(Vivekananthan D.P. et al., 2003; Shekelle P.G. et al., 2004; Gaziano J.M. et al., 2009; Stratton J. et al., 2011).

Miller e collaboratori nel 2005 pubblicano i risultati di una metanalisi che correla positivamente l'assunzione di alti dosaggi di VE ad un aumento generale della mortalità (*all causes*) (Miller E.R. et al., 2005). Allo studio di Miller ne sono succeduti altri, che hanno confermato una correlazione significativa tra assunzione di VE e l'aumento del rischio associato ad alcune forme di tumore come l'adenocarcinoma polmonare, i tumori cutanei non-melanoma, e la neoplasia maligna del colon retto (Burns E.M. et al., 2013; Cohen C. et al., 2014; Wu Q.J. et al., 2015).

Simili risultati destarono forti preoccupazione nella comunità scientifica, alla luce del fatto che, in particolare negli USA, buona parte della popolazione fa uso di integratori a base di VE proprio in virtù delle sue proprietà chemiopreventive (Bailey R.L. et al., 2011). Una diffusione così ampia di questi prodotti è anche dovuta alla credenza sicuramente errata, ma ben diffusa nella popolazione comune, che gli antiossidanti non possano costituire un problema per la salute, ma al contrario, le loro proprietà benefiche porterebbero univocamente ad un miglioramento della qualità della vita. Halliwell B. ha sintetizzato in maniera efficace il concetto di cui sopra con lo "slogan" "*antioxidant is good, more antioxidant is better*". (Halliwell B. et al., 2012).

Allo scopo di chiarire il ruolo della VE sulla salute pubblica fu lanciato il *Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT)*. Il primo report pubblicato nel 2009 (Lippman S.M. et al., 2009) confermò che l'assunzione giornaliera di VE, così come la co-somministrazione di Selenio e VE non sono in grado di esplicitare alcun effetto benefico in pazienti sani al momento dell'arruolamento. Al contrario, i risultati del secondo follow-up, hanno evidenziato un rischio d'incidenza significativamente

più alta per il cancro alla prostata nel braccio di intervento a cui fu somministrata la sola VE (Klein E.A. et al., 2011).

Tuttavia, il meccanismo tossicologico che ha portato ai risultati sopracitati rimane ancora sconosciuto.

E' noto dalla letteratura come la VE possa indurre l'espressione di alcune isoforme del citocromo P450 (CYP), (Mustacich D.J. et al., 2006; Traber M.G. et al., 2010; Johnson C.H. et al, 2012 JoMurray M. et al., 1991; Sidorova Y.A. et al., 2003). L'induzione di tale sistema enzimatico è stata correlata ad un aumento della produzione di ROS (Paolini et al., 1996; Puntarulo S. et al., 1998), inoltre è stato dimostrato come un aumento dell'espressione del CYP possa causare lesioni al DNA partecipando al meccanismo di cancerogenesi (Wang Y. et al., 2009).

Abbiamo pertanto ipotizzato che la VE potrebbe, attraverso l'induzione di isoforme del CYP a livello prostatico, aumentare la bioattivazione di pre-mutageni/pre-cancerogeni ubiquitari e innescare una sovrapproduzione di ROS nel tessuto, agendo quindi come co-cancerogeno.

Lo scopo del presente progetto di ricerca è stato quindi quello di verificare tale ipotesi, mediante lo studio *in vivo* e *in vitro* degli effetti della VE sul *drug metabolism*, sugli enzimi antiossidanti nonché il suo possibile effetto pro-ossidante a

3. Materiali e Metodi

3.1. Esperimento *in vivo*

3.1.1. Trattamento animale

Ratti del ceppo Sprague-Dawley del peso di 150-180 g sono stati acquistati da Harlan Laboratories S.r.l. e sono stati stabulati in condizioni ambientali standardizzate.

Condizioni ambientali	Valori
Ore di luce	12
Ore di buio	12
Temperatura	22 ± 1°C
Umidità	60 ± 10%

Tabella 3.1. Parametri ambientali di stabulazione.

L'esperimento è stato condotto in conformità con le linee guida della National Academy of Science e in accordo con la direttiva europea 2010/63/EU.

Il protocollo sperimentale è stato approvato dal Comitato Etico per la Sperimentazione Animale dell'Università di Bologna.

Per l'intera durata dell'esperimento gli animali sono stati alimentati con mangime standard per roditori cui è stato concesso l'accesso ad *libitum*.

Dopo un periodo di giorni di prestabulazione, gli animali sono stati assegnati random alle cinque unità sperimentali formate da sei animali ciascuna.

La Vitamina E nella forma di DL all-rac α -Tocoferolo (Sigma-Aldrich) è stata somministrata intraperitonealmente alle dosi di 100 o 200 mg/kg p.c. per un periodo complessivo di sette o quattordici giorni consecutivi.

Il gruppo di controllo ha ricevuto il solo veicolo (olio di semi di mais).

Al termine del trattamento sono stati prelevati fegato reni e prostata da ciascun animale.

L'organo appena espantato è stato sottoposto ad un rapido lavaggio in PBS e successivamente congelato in azoto liquido (-196°C). Gli organi sono stati successivamente trasferiti in un ultrafreezer (-80°C) e stoccati fino al momento dell'utilizzo.

3.1.2. Preparazione della frazione microsomiale e citosolica

L'organo dopo essere stato prelevato viene 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 inficerebbero il risultato della determinazione delle attività enzimatiche in studio. L'organo viene successivamente omogenato utilizzando il tampone sopra citato. Si esegue quindi una centrifugazione a 9.000 x g alla temperatura di 2-3°C per 20 minuti. La frazione sovranatante (post-mitocondriale S9) così ottenuto viene collezionato e nuovamente sottoposto a centrifugazione a 105.000 x g per 65 minuti ad una temperatura compresa tra 0 e 4°C in ultracentrifuga.

Il sovranatante (citosol) viene recuperato e stoccato a -80°C, mentre il precipitato viene ripreso in un tampone $K_2P_2O_7$ 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 x g per 65 minuti ad una temperatura compresa tra 0 e 4°C. Il precipitato risospeso in tampone Tris-Acetato 10 mM (pH 7.4) con EDTA 1 mM e glicerolo 20% viene congelato in azoto liquido e costituisce la frazione microsomiale. (Paolini et al., 1983).

3.1.3. Determinazione della concentrazione proteica nelle frazioni cellulari

(metodo di Lowry)

La quantificazione del contenuto proteico della frazione microsomiale e citosolica è stata ottenuta seguendo il metodo di Lowry utilizzando albumina di siero bovino BSA come standard (Lowry e altri, 1951).

3.1.4. Enzimi di fase I

3.1.4.1. Citocromo P450

La determinazione del citocromo P450 viene effettuata attraverso la tecnica di Omura e Sato (1964). La riduzione del ferro contenuto nel gruppo eme induce nel citocromo la capacità di legare il monossido di carbonio (CO) conferendo al complesso uno specifico picco di assorbimento tra 447 e 452 nm (Omura T. et al, 1964).

3.1.4.2. NADPH-citocromo (P450)-c-reduttasi

Il NADPH citocromo (P450) c reduttasi è in grado di ridurre il gruppo eme del citocromo c sfruttando il flusso di elettroni fornito dal NADPH. Si otterrà un prodotto di reazione che presenta una assorbanza specifica a 550 nm. Il coefficiente di estinzione molare $\epsilon = 19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ sarà impiegato per il calcolo dell'attività catalitica specifica.

3.1.4.3. Amminopirina N-demetilasi (APND)

L'isoforma CYP3A1/2 demetilando in modo specifico l'amminopirina, da origine ad un composto dealchilato e formaldeide.

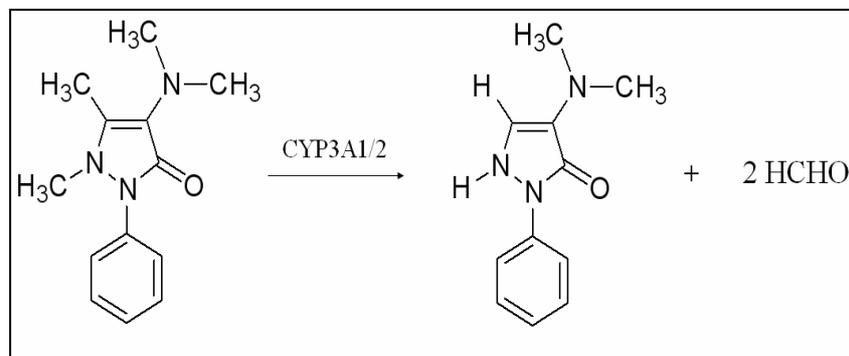


Figura 3.1. Metabolismo dell'amminopirina da parte dell'isoforma CYP3A1/2.

La formaldeide, se fatta reagire con acetilacetone e sali di ammonio (reagente di Nash), formando la 3,5-diacetil-1,4-diidrolutidina (DDL), che, avendo assorbanza specifica a 412 nm, può essere facilmente monitorato spettrofotometricamente. L'attività specifica si calcola utilizzando il coefficiente di estinzione molare $\epsilon = 8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Nash T., 1953).

3.1.4.4. p-Nitrofenolo idrossilasi (pNFI)

Utilizzando il coefficiente di estinzione molare $\epsilon = 10.38 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Reinke M.A. et al, 1985), è possibile calcolare l'attività specifica dell'isoforma CYP2E1, sfruttando la conversione del p-nitrofenolo a 4-nitrocatecolo che, in ambiente alcalino, assorbe a 546nm.

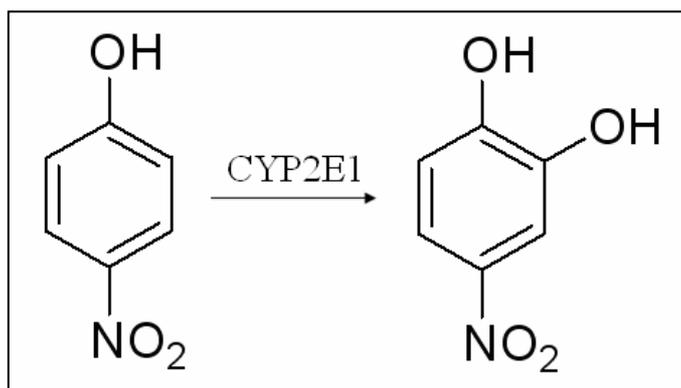


Figura 3.2. Formazione del 4-nitrocatecolo ad opera dell'isoforma CYP2E1.

3.1.4.5. Pentossiresorufina O-dealchilasi (PROD) Metossiresorufina O-demetilasi (MROD) Etossiresorufina O-deetilasi (EROD)

Il miscuglio di reazione per la determinazione dell'isoforma CYP2B1/2 è formato da 0.025 mM di MgCl₂, 200 mM di pentossiresorufina, 0,32 mg di proteine (frazione microsomiale) e 130 mM di NADPH in tampone Tris-HCl 0.05 M. Il prodotto di reazione è la resorufina, la cui formazione viene monitorata spettrofluorimetricamente seguendo un aumento del suo segnale di fluorescenza a 558 nm (Lubet R.A. et al, 1985).

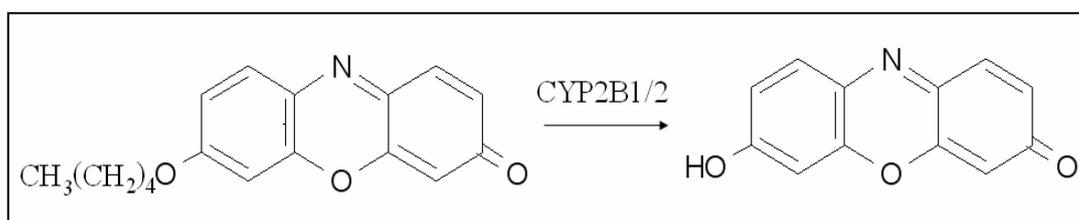


Figura 3.3. Metabolismo della pentossiresorufina a resorufina ad opera dell'isoforma CYP2B1/2.

L'attività delle isoforme CYP1A2 e CYP1A1 viene determinata in maniera del tutto analoga a quanto descritto per CYP2B1/2. Il probe specifico per il CYP1A2 è la metossiresorufina, mentre l'etossiresorufina, è impiegata per valutare l'attività del CYP1A1. metossiresorufina, ed etossiresorufina vengono entrambe metabolizzate a resorufina, la cui formazione sarà monitorata a 558 nm. La metossiresorufina viene utilizzata a concentrazioni di 5 mM, mentre l'etossiresorufina a concentrazioni di 1.7 mM.

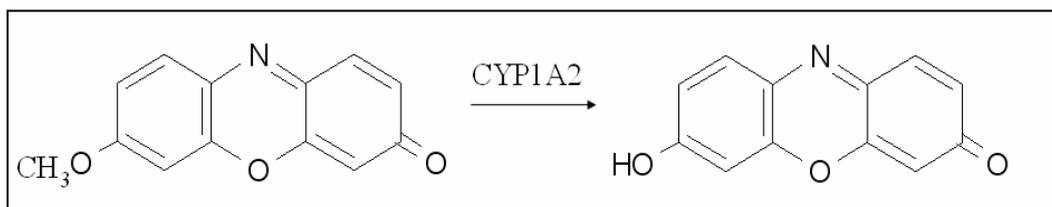


Figura 3.4. Metabolismo della metossiresorufina a resorufina ad opera dell'isoforma CYP1A2.

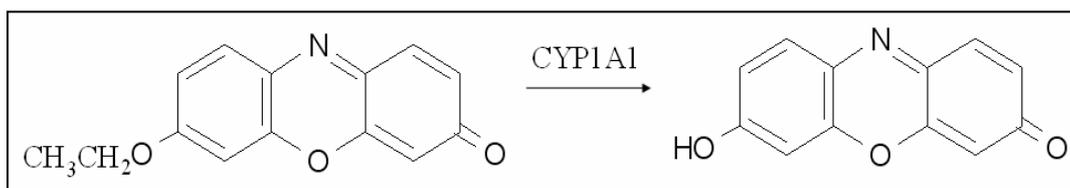


Figura 3.5. Metabolismo dell'etossiresorufina a resorufina ad opera dell'isoforma CYP1A1.

3.1.4.6. Etossicumarina O-deetilasi (ECOD)

Diverse isoforme di citocromo P450 come CYP1A1/2, CYP2A, CYP2B e CYP2E1 sono in grado di dealchilare la 7-etossicumarina. Il prodotto che ne deriva è l'umbelliferone che emette fluorescenza a 440 nm in ambiente alcalino.

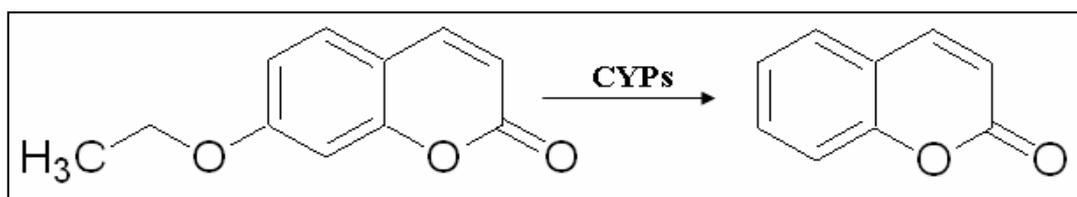


Figura 3.6. Metabolismo della 7-etossicumarina da parte di diverse isoforme CYPs.

L'attività specifica viene determinata utilizzando una curva di taratura ottenuta impiegando quantità note di prodotto di reazione (umbelliferone) (Aitio A.1978).

3.1.5. Enzimi di fase II

3.1.5.1. Glutatione S-transferasi (GST)

Il legame del glutatione ridotto (GSH) con il 1-Cl-2,4-dinitrobenzene (CDNB) catalizzato dall'enzima GST, che assorbe in modo specifico a 340 nm e può quindi essere rilevato spettrofotometricamente.

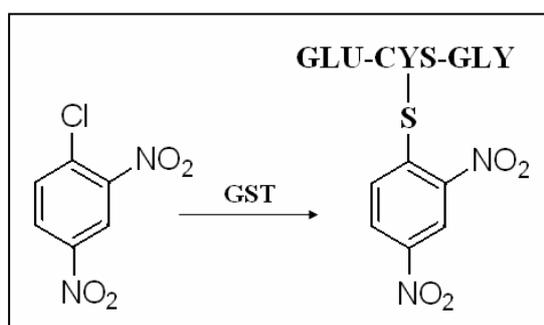


Figura 3.7. Coniugazione del CDNB con glutatione.

L'attività specifica viene calcolata utilizzando il coefficiente di estinzione molare $\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Habig W.H. et al, 1974).

3.1.5.2. Determinazione della UDP-glucuronosil-transferasi (UDPGT)

L'UDPGT catalizza la formazione di un legame glicosidico fra il substrato 1-naftolo e l'acido glucuronico. Il prodotto di reazione, l'1-naftolo-glucuronide, può essere monitorato spettrofluoricamente in quanto emette fluorescenza a 335 nm.

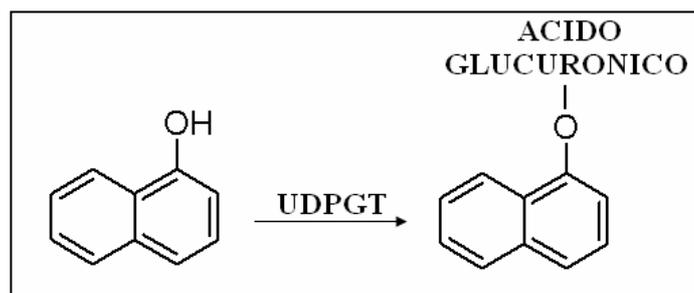


Figura 3.8. Glucuroconiugazione dell'1-naftolo.

3.1.6. Enzimi antiossidanti

Per la determinazione dell'attività antiossidante è stata determinata sulla frazione citosolica.

3.1.6.1. Catalasi (CAT)

L'attività della catalasi è stata misurata tramite 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 moli di H_2O_2 consumate per minuto per milligrammo di proteine cellulari.

3.1.6.2. 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 L., 1967).

3.1.7. Estrazione dell'RNA e preparazione del cDNA

3.1.7.1. Estrazione dell'RNA totale

I tessuti utilizzati per l'estrazione dell'RNA sono stati prelevati in condizioni di sterilità e conservati a -80°C . Per l'estrazione dell'RNA totale è stato utilizzato il kit commerciale "Rneasy® Mini kit" (Quiagen), che consente di ottenere una resa elevata lavorando a temperatura ambiente.

Prima dell'estrazione, i campioni di fegato e intestino (circa 20 mg) sono stati omogeneizzati utilizzando il "tissue lyser" (Quiagen), in una soluzione contenente 600 μl di "buffer RLT" e 6 μl di β -mercaptoetanololo. L'estrazione è proseguita seguendo il protocollo indicato dal produttore. La soluzione finale ottenuta, contenente l'RNA, è stata conservata a -80°C fino al momento dell'utilizzo.

2.1.7.2. Quantificazione e controllo dell'RNA

I campioni di RNA totale sono stati quantificati utilizzando il Nano-Drop, un nano spettrofotometro, che consente sia di determinare la concentrazione di RNA estratto.

La concentrazione viene calcolata sfruttando il valore di assorbimento alla lunghezza d'onda di 260 nm, mentre la purezza viene valutata sul rapporto di assorbimento tra 260/280 nm e 260/230 nm. È stato scelto il valore di 1,7 come riferimento per una

misura che indichi un contenuto adeguato di acidi nucleici rispetto al contenuto di proteine.

Successivamente è stata valutata l'integrità dell'RNA facendo una corsa elettroforetica in gel di agarosio all'1%.

3.1.7.3. Trattamento con DNasi e retrotrascrizione dell'RNA

Il trattamento per l'eliminazione dell'eventuale DNA genomico contaminante e la reazione di retrotrascrizione sono stati effettuati in un unico passaggio, utilizzando il kit commerciale "iSCRIPT™ cDNA Synthesis Kit" (Bio-Rad). In eppendorf è stata preparata una miscela di reazione per campione aggiungendo una soluzione di RNA del volume di 60 µl contenente 4µg di RNA, 16 µl di 5x iScript reaction mix e 4 µl di iScript reverse transcriptase, per un volume finale di 80 µl. I campioni sono stati incubati secondo le seguenti tempistiche e temperature: 5 minuti a 25°C, 30 minuti a 42°C, 5 minuti a 85°C, con holding a 4°C, e conservate in congelatore a -20°C.

3.1.7.4. Controlli utilizzati per la RT-PCR

Al fine di verificare l'efficacia del trattamento con la DNasi e poter escludere, quindi, la contaminazione da DNA genomico, che avrebbe potuto interferire con il cDNA nelle reazioni di amplificazione genica, è stata effettuata per ogni campione una prova "NO-RT" durante la reazione di retrotrascrizione. Questa prova consiste nel realizzare una mix in cui sono presenti tutti i reagenti tranne l'enzima (reverse-transcriptase). Le reazioni "NO-RT" sono poi state sottoposte a retrotrascrizione e corsa elettroforetica su gel di agarosio. Per verificare l'avvenuta retrotrascrizione dell'RNA è stata effettuata su tutti i campioni una PCR con primers specifici per il gene housekeeping β -actina.

Inoltre, per evidenziare eventuali contaminazioni da DNA nei reagenti necessari per l'amplificazione genica è stato fatto un controllo negativo per ogni reazione (bianco), in cui erano presenti tutti i componenti tranne il cDNA.

3.1.7.5. Real-time PCR

La PCR real-time è una tecnica di amplificazione del DNA che, seguendo ad ogni ciclo di PCR (cioè in “real-time”) l'aumento di fluorescenza associato all'incremento del numero di copie del frammento di DNA di interesse, permette di quantificarne accuratamente il contenuto iniziale.

La miscela di reazione è stata allestita aggiungendo:

- 2 µl di cDNA (diluito 1:10) ottenuto mediante reazione di retro trascrizione,
- 10 µl di “SoFast™ EvaGreen® Supermix” (Bio-Rad),
- 2 µl di primer senso (da soluzione 4 µM),
- 2 µl di primer antisenso (da soluzione 4 µM),
- 4 µl di H₂O per ottenere un volume finale di 20 µl.

Per l'amplificazione si è fatto uso del programma suggerito dal manuale fornito insieme alla soluzione “SoFast™ EvaGreen® Supermix” (Bio-Rad) e la reazione è stata fatta avvenire in un termocicizzatore “Rotor-Gene® RG 3000” (Diatech).

3.1.7.6. Primer utilizzati

I primer sono stati disegnati seguendo questa procedura:

- la sequenza nucleotidica dei trascritti dei geni d'interesse è stata ricercata in banca dati (GeneBank) e quindi scaricata;

- le varie sequenze sono state allineate e analizzate mediante il software CLUSTALW 1.61;

- sulla base delle sequenze specifiche sono stati scelti dei primer della lunghezza di circa 20 nucleotidi utilizzando il software OLIGO (disponibile in rete) ed utilizzando alcuni accorgimenti, quali mantenere un contenuto di guanina e citosina $\geq 50\%$ ed evitare che i primer abbiano sequenze tali da potersi appaiare tra loro o formare strutture stabili (loops) al 3', riducendo così l'efficienza di amplificazione.

La temperatura di annealing (T_a) è specifica per ogni coppia di primer ed è stata calcolata con la formula: (2 °C per ogni A/T + 4 °C per ogni G/C) – 5 °C. Inoltre, dopo aver stimato la T_a per ogni primer con la formula appena descritta, ogni coppia di primer è stata poi testata a differenti temperature per rilevare la migliore temperatura di annealing.

3.1.8. Spettroscopia di risonanza di spin elettronico (EPR) abbinata alla tecnica radical trapping per la determinazione dello stress ossidativo (OSS)

Una porzione del tessuto oggetto di analisi (circa 2 mg) è stato prelevato da ciascun animale e immediatamente immerso in 1 mL (1mM) di EDTA (1mM) di soluzione di idrossilamina e soluzione fisiologica. L'idrossilamina utilizzata in questo studio è bis(1-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidiny) decandioate che ha la capacità di intrappolare la maggior parte dei radicali incentrati sull'ossigeno, il carbonio, e l'azoto, inclusi il superossido e il perossido di nitrile (Valgimigli L. et al., 2001). La reazione porta alla formazione di un nitrossido stabile che può essere accuratamente quantificato dallo spettroscopio EPR (Valgimigli L. et al., 2000; Valgimigli L. et al., 2001; Valgimigli M. et al., 2002; Paolini M. et al., 2003). Il campione viene incubato a 37°C per 5 minuti, quindi congelato in azoto liquido e successivamente stoccato a -

80°C fino al momento dell'utilizzo. Le condizioni ottimali per la concentrazione di idrossilammina utilizzata e il tempo incubazione del campione sono state determinate nello studio di Valgimigli L. et al.,2000; Valgimigli L. et al., 2001; Valgimigli M. et al.,2002). Prima della misurazione ogni campione deve essere portato a temperatura ambiente e 50 uL della soluzione in cui è stato immerso il tessuto viene prelevata ed inserita in un capillare di vetro che sarà accolto all'interno dello strumento Bruker ESP 300 EPR spectrometer (Bruker Biospin S.r.l., Rheinstetten, Germany). Lo spettro di risonanza del nitrossido formato dalla reazione tra i radicali presenti nel tessuto e la sonda (idrossilammina) è stato monitorato settando lo strumento ad una ampiezza di modulazione di 1•0 G, tempo di conversione 163•84 ms, modulazione di frequenza 100 kHz; "microwave power" = 6.4 mW. L'intensità della prima linea dello spettro è stata scelta come riferimento per il calcolo della concentrazione dei radicali. Lo strumento è stato calibrato utilizzando uno standard di TEMPO-coline in acqua.

I risultati sono espressi come umol di radicali per grammo di tessuto.

3.2. Esperimento *in vitro*

La linea cellulare RWPE-1 di epitelio prostatico sono state ottenute da tessuto sano di pazienti adulti. Le cellule sono state poste in coltura incubatore a condizioni standard.

Condizioni di coltura	Valori
Ossigeno	95%
Anidride carbonica	5%
Temperatura	37°C
Umidità	95%

Tabella 3.2. Parametri ambientali di stabulazione.

Le cellule sono state poste in terreno di coltura KSFM con aggiunta di EGF umano ricombinante ed estratto di ghiandola pineale (BPE) (Gibco, USA).

La vitamina E (DL all-rac α -Tocoferolo) è stata disciolta in dimetilsolfossido (DMSO) ed aggiunta al terreno di coltura.

3.2.1. Test di vitalità cellulare

La vitalità cellulare è stata misurata con il test del sulforodamina B (SRB): le cellule dopo essere state seminate in una piastra 96 pozzetti (10^4 /pozzetto), sono state trattate con Vitamina E a dosi scalari da 20 μ M fino a 100 μ M per 24 o 72 ore.

Il campione di controllo è stato trattato con il solo DMSO alla concentrazione massima utilizzata per il trattamento (0.1%).

Al termine dell'esposizione le cellule sono state fissate e marcate con SRB secondo il protocollo (Sigma-Aldrich). L'assorbanza è stata misurata a 570 nm in un lettore a micropiastre (Bio-Rad).

3.2.2. Test ELISA per la determinazione della prostaglandina E₂ (PGE₂)

Le cellule sono state seminate in una piastra a 6 pozzetti alla densità di 3×10^5 /pozzetto, in terreno serum-free per 24 ore e trattate con Vitamina E o DMSO.

Al termine dell'esposizione, le cellule sono state raccolte, centrifugate a 500xg per 5 minuti a 4°C e il supernatante è stato raccolto ed analizzato seguendo le istruzioni del kit ELISA (Cayman, Ann Arbor, USA).

3.2.3. Spettroscopia di risonanza di spin elettronico (EPR) abbinata alla tecnica radical trapping per la determinazione dello stress ossidativo (OSS)

Le cellule sono state seminate in una piastra a 6 pozzetti alla densità di 7×10^5 /pozzetto in terreno serum-free per per 24 ore e trattate con Vitamina E o DMSO. Al termine del trattamento il mezzo di coltura è stato eliminato e le cellule raccolte e centrifugate 300xg a 4°C per 5 minuti. Le cellule sono state quindi risospese in 500 µL di PBS 1X a cui è stato aggiunto 500 µL di idrossilammina (bis(1-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidiny) decandioate).

Dopo un'incubazione a 37°C per 5 minuti, 50 µL sono stati trasferiti in un capillare per l'analisi allo strumento EPR.

3.2.4. Estrazione dell'RNA e RT-PCR

L'RNA totale è stato estratto utilizzando il reagente Trizol (Life Technologies, CA, USA) in accordo con le istruzioni del kit. L'RNA estratto è stato trattato con DNase I per rimuovere possibili contaminazioni da DNA genomico (Ambion, USA).

L'mRNA delle isoforme CYP testate e della β-actina usata come standard interno, è stato analizzato mediante l'utilizzo di SYBR-Select Master Mix (Life Technologies,

CA, USA). Ciascun campione è stato analizzato in triplicato e i livelli di mRNA sono stati normalizzati per i livelli di β -actina.

3.3. Analisi statistica

La significatività statistica per le attività enzimatiche e l'analisi dei ROS è stata determinata mediante l'utilizzo del test non parametrico di Wilcoxon.

La significatività sulle analisi di espressione genica mediante RT-PCR su tessuto e su cellule RWPE-1 sono stati eseguiti tramite ANOVA con il test di Bonferroni.

La probabilità di evenienza casuale p , è stata stabilita ponendo come limiti di significatività * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

4. Risultati

4.1. Effetti della vitamina E sugli enzimi del drug-metabolism

Le attività enzimatiche sono state indagate con l'impiego tecniche spettrofotometriche e spettrofluorimetriche mediante l'utilizzo di substrati come *probes* specifici per le diverse isoforme.

I valori sono riportati come moli (mol) di prodotto risultate della reazione enzimatica in 1 minuto per milligrammo (mg) di contenuto proteico. ($\text{mol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$)

Substrati	Enzimi
Citocromo c	reduttasi
Aminopirina	CYP3A1/2
Etossicumarina	CYP3A1/2, 2A, 2B, 2E1
Etossiresorufina	CYP1A1
Metossiresorufina	CYP1A2
Paranitrofenolo	CYP2E1
Pentossiresorufina	CYP2B1/2

Tabella 4.1 Substrati impiegati per le diverse isoforme.

4.1.1. Sistema monoossigenasico epatico

La Tabella 4.2 e la Figura 4.1 mostrano i dati relativi al contenuto totale di citocromo P450 (CYP) e le attività enzimatiche relative a diverse isoforme determinate tramite l'utilizzo di diversi "probe" specifici.

L'attività dell'etossiresorufina *O*-deetilasi (EROD) è stata ridotta in ciascun gruppo, con valori che oscillano dal 21% fino al 32% ($p < 0.01$). NADPH-cytochrome (P450) c-reduttasi ha riportato una flessione di circa il 19% dopo quattordici giorni di trattamento alla dose di 100 mg/kg p.c. ($p < 0.01$).

Le attività associate all'isoforma CYP3A1/2 mostra un calo dopo trattamento con dose minima per sette giorni (circa 11%; $p < 0.05$), l'isoforma CYP1A2 ha riportato un generale trend di inattivazione con valori che oscillano dal 18% al 31% ($p < 0.01$).

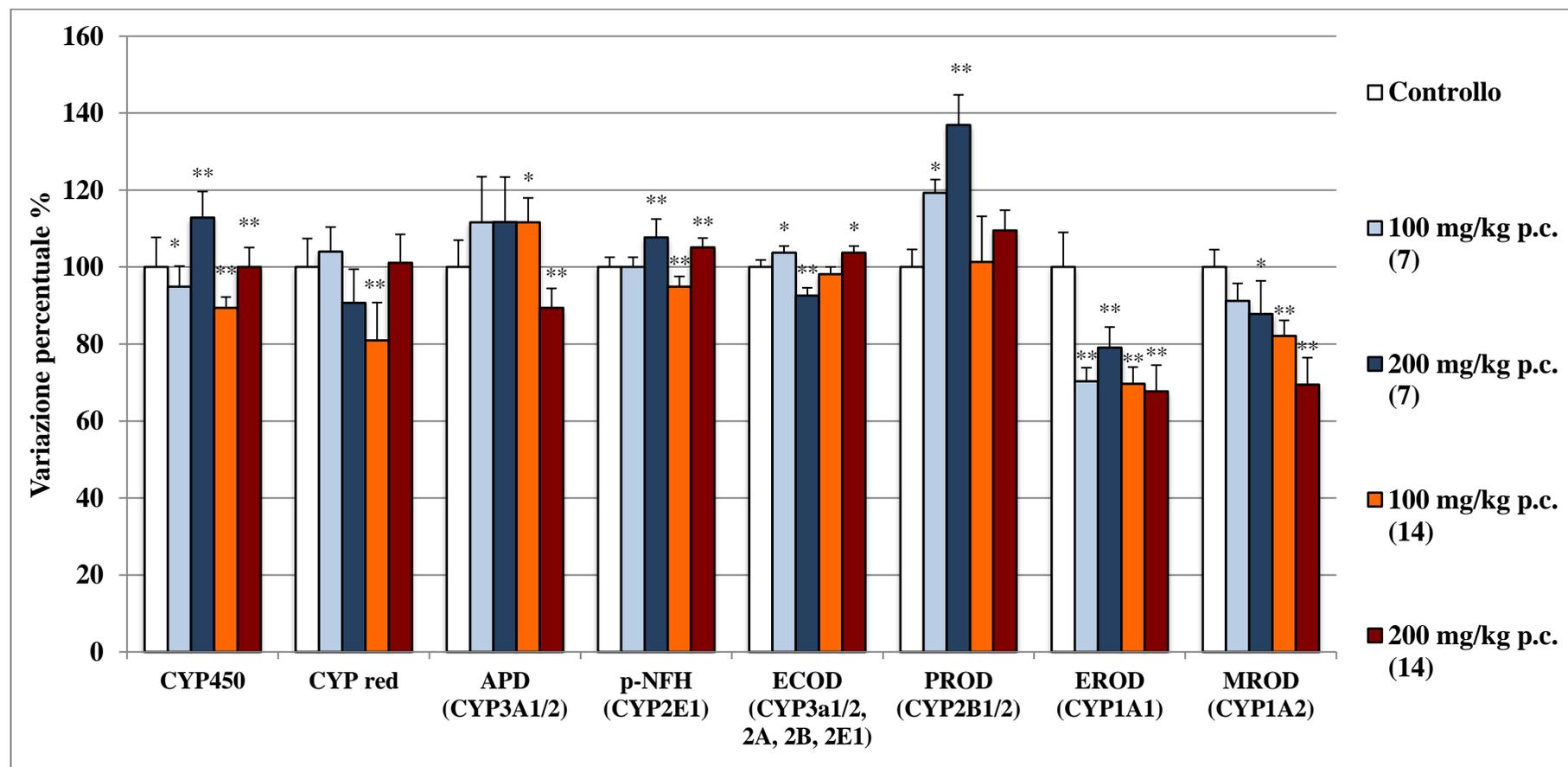
Al contrario, l'integrazione con 200 mg/kg p.c. ha portato ad un significativo aumento, se pur debole, del contenuto totale di CYP (13%; $p < 0.01$) e dell'attività dell'isoforma CYP2B1/2 (37% a sette giorni di trattamento; $p < 0.01$). L'attività CYP2E1 dipendente ha registrato un leggero aumento (5%; $p < 0.01$) nei gruppi sperimentali che hanno ricevuto la dose massima impiegata.

Tabella 4.2 Effetti della vitamina E sul sistema monoossigenasico P450 dipendente in fegato

Parametri	Controllo	Trattamento (sette giorni)		Trattamento (quattordici giorni)	
		100 mg/kg p.c.	200 mg/kg p.c.	100 mg/kg p.c.	200 mg/kg p.c.
Cytochrome P450 (nmol × mg ⁻¹)	0.39±0.03	0.37±0.02*	0.44±0.03**	0.35±0.01**	0.39±0.02
NADPH-cytochrome (P450) reductase (nmol × mg ⁻¹ × min ⁻¹)	21.05±1.56	21.90±1.38	19.10±1.67	17.04±1.67**	21.29±1.57
Aminopyrine <i>N</i> -demethylase (nmol × mg ⁻¹ × min ⁻¹) (CYP3A1/2)	27.01±1.88	30.15±3.56	30.00±3.51	30.14±1.93*	24.14±1.22**
p-Nitrophenol hydroxylase (nmol × mg ⁻¹ × min ⁻¹) (CYP2E1)	0.39±0.01	0.39±0.01	0.42±0.02**	0.37±0.01**	0.41±0.01**
Ethoxycoumarin <i>O</i> -deethylase (pmol × mg ⁻¹ × min ⁻¹)	0.54±0.01	0.56±0.01*	0.50±0.01**	0.53±0.01	0.56±0.01*
Pentoxyresorufin <i>O</i> -dealkylase (pmol × mg ⁻¹ × min ⁻¹) (CYP2B1/2)	10.48±0.48	12.50±0.43*	14.35±1.12**	10.62±1.26	11.48±0.60
Ethoxyresorufin <i>O</i> -deethylase (pmol × mg ⁻¹ × min ⁻¹) (CYP1A1)	28.13±2.45	19.77±0.70**	22.23±1.81**	19.58±0.84**	19.04±1.30**
Methoxyresorufin <i>O</i> -demethylase (pmol × mg ⁻¹ × min ⁻¹) (CYP1A2)	24.64±1.12	22.48±1.19	21.64±1.86*	20.24±0.82**	17.11±1.20**

I risultati sono la media ± deviazione standard (S.D.) 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 4.1 Effetti della itamina E sul sistema monoossigenasico P450 dipendente in fegato



Il grafico rappresenta la media \pm deviazione standard (S.D.) di sei esperimenti indipendenti eseguiti su sei animali * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ rispetto al controllo, secondo il test non parametrico di Wilcoxon.

4.1.2. Sistema monoossigenasico in rene

La Tabella 4.3. e la Figura 4.2. riportano i valori delle attività enzimatiche CYP dipendenti nel tessuto renale. Entrambe le dosi e le tempistiche di trattamento adottate hanno portato ad una induzione della maggior parte delle isoforme testate.

L'isoforma CYP2E1 è stata indotta dal trattamento con dose massima a sette giorni e da entrambe le dosi a quattordici giorni dove il fenomeno raggiunge valori superiori al 100%, fino ad un massimo di 160% alla dose massima ($p < 0.01$).

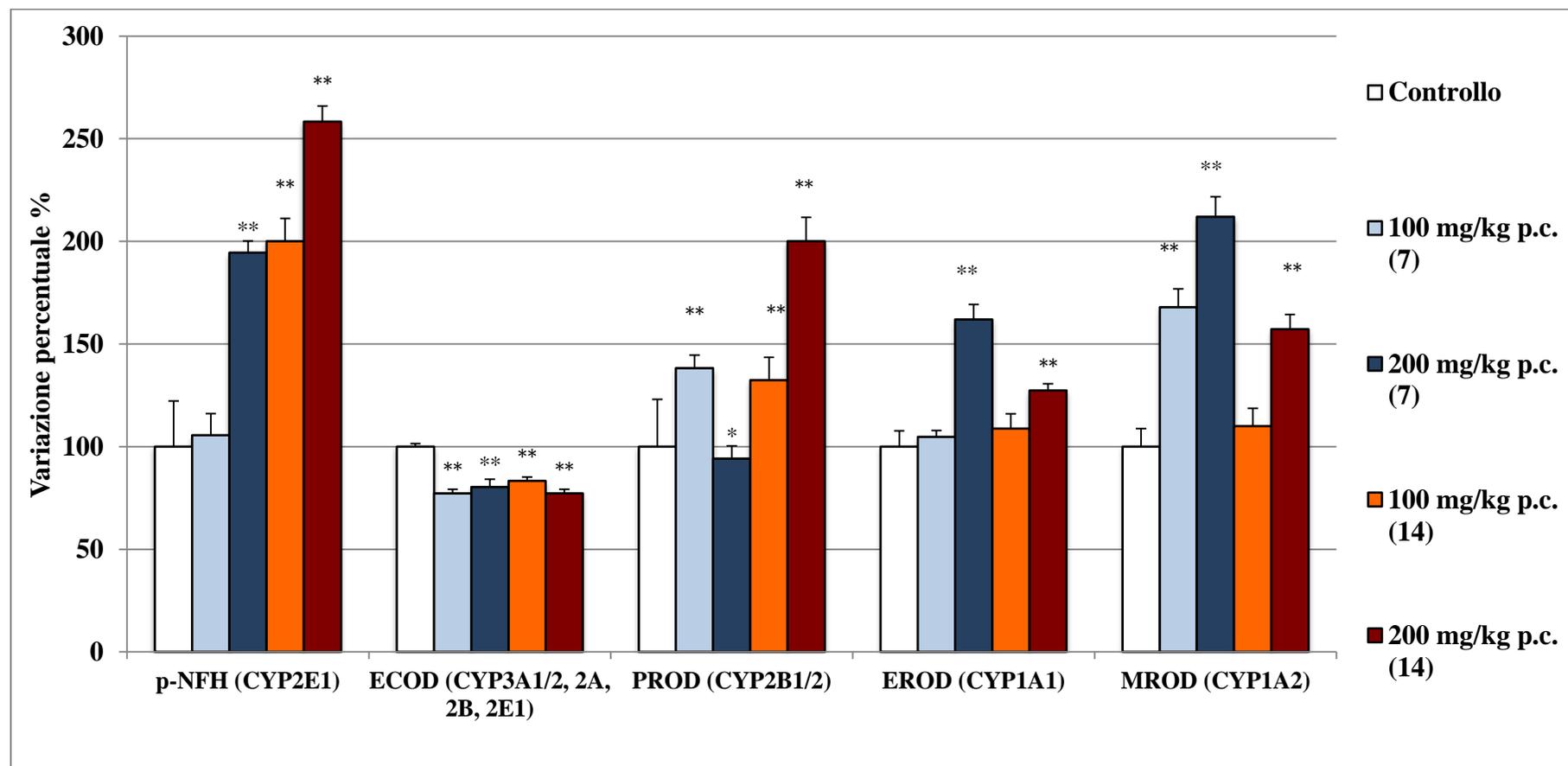
Una significativa *up-regulation* si può apprezzare per l'isoforma CYP2B1/2 nei gruppi che hanno ricevuto la dose massima ($p < 0.01$) o la dose massima per quattordici giorni, al contrario, una leggera inattivazione è stata osservata in seguito a trattamento con dose massima per sette giorni (circa 6%; $p < 0.05$). L'attività associata all'isoforma CYP1A2, ha riportato un generale aumento rispetto al controllo, in particolare, il gruppo sperimentale trattato con la dose di 200 mg/kg p.c. per sette giorni ha riportato un valore doppio di quello registrato nel gruppo di controllo ($p < 0.01$). L'etossicumarina deetilasi riporta al contrario una modesta inattivazione che raggiunge il valore massimo di circa il 23% nel gruppo sperimentale a cui è stata somministrata la dose di 100 mg/kg p.c. per sette giorni ($p < 0.01$).

Tabella 4.3 Effetti della vitamina E sul sistema monoossigenasico P450 dipendente in rene

Parametri	Controllo	Trattamento (sette giorni)		Trattamento (quattordici giorni)	
		100 mg/kg p.c.	200 mg/kg p.c.	100 mg/kg p.c.	200 mg/kg p.c.
p-Nitrophenol hydroxylase ($\text{nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) (CYP2E1)	0.36±0.08	0.38±0.04	0.70±0.04**	0.72±0.08**	0.93±0.07**
Ethoxycoumarin <i>O</i> -deethylase ($\text{pmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$)	0.66±0.01	0.51±0.01**	0.53±0.02**	0.55±0.01**	0.51±0.01**
Pentoxoresorufin <i>O</i> -dealkylase ($\text{pmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) (CYP2B1/2)	0.34±0.08	0.47±0.03**	0.32±0.02*	0.45±0.05**	0.68±0.08**
Ethoxyresorufin <i>O</i> -deethylase ($\text{pmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) (CYP1A1)	3.61±0.28	3.78±0.12	5.87±0.43**	3.93±0.28	4.60±0.15**
Methoxyresorufin <i>O</i> -demethylase ($\text{pmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) (CYP1A2)	1.59±0.14	2.67±0.24**	3.37±0.33**	1.75±0.15	2.50±0.18**

I risultati sono la media \pm deviazione standard (S.D.) 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 4.2. Effetti della vitamina E sul sistema monoossigenasico P450 dipendente in rene



Il grafico rappresenta la media \pm deviazione standard (S.D.) di sei esperimenti indipendenti eseguiti su sei animali * p < 0.05 e ** p < 0.01 rispetto al controllo, secondo il test non parametrico di Wilcoxon.

4.1.3. Sistema monoossigenasico in prostata

I saggi enzimatici condotti su sul tessuto prostatico mostrano come la vitamina E abbia prodotto una generale induzione delle in isoforme CYP2B1/2 e CYP1A2 in ciascun gruppo sperimentale ($p < 0.01$).

L'attività di dealchilazione della pentossiresorufina (PROD) mostra un aumento percentuale che varia dal 25% riscontrato nel gruppo sperimentale che ha ricevuto la dose minima per sette giorni, fino al 124% riscontrato nell'unità sperimentale trattata con 200mg/kg p.c. per sette giorni. I dati inerenti all'attività dell'isoforma CYP1A2 mostrano induzioni più marcate, entrambi le dosi a quattordici giorni, così come la dose massima, somministrata per sette giorni, hanno provocato un aumento di oltre il 100% ($p < 0.01$).

I risultati sono riassunti nella Tabella 4.4. e in Figura 4.3.

In Figura 4.4. è riportata l'analisi dell'espressione geniche delle isoforme CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1.

I livelli di espressione dell'mRNA dell'isoforma CYP1A1 risultano significativamente più alti rispetto al controllo in ciascuno dei gruppi sperimentali. In particolare è possibile notare come il trattamento a sette giorni abbia prodotto circa un raddoppio dei livelli di messaggero ($p < 0.001$), indipendentemente dalla dose somministrata. Al quattordicesimo giorno di trattamento il fenomeno è più marcato, con valori di mRNA che superano di tre volte quelli registrati nel controllo ($p < 0.01$). L'isoforma CYP1A2 ha riportato livelli di espressione genica maggiori rispetto al controllo in tutte le unità sperimentali, tuttavia, la magnitudo del fenomeno è inferiore rispetto a quanto osservato per CYP1A1. Come si può evincere dal grafico, si sono registrati incrementi che oscillano dal 50% fino all'88% ($p < 0.001$). Il

trattamento con 100 mg/kg p.c. per quattordici giorni ha riportato un effetto maggiore, raggiungendo un incremento superiore al 300% ($p < 0.01$).

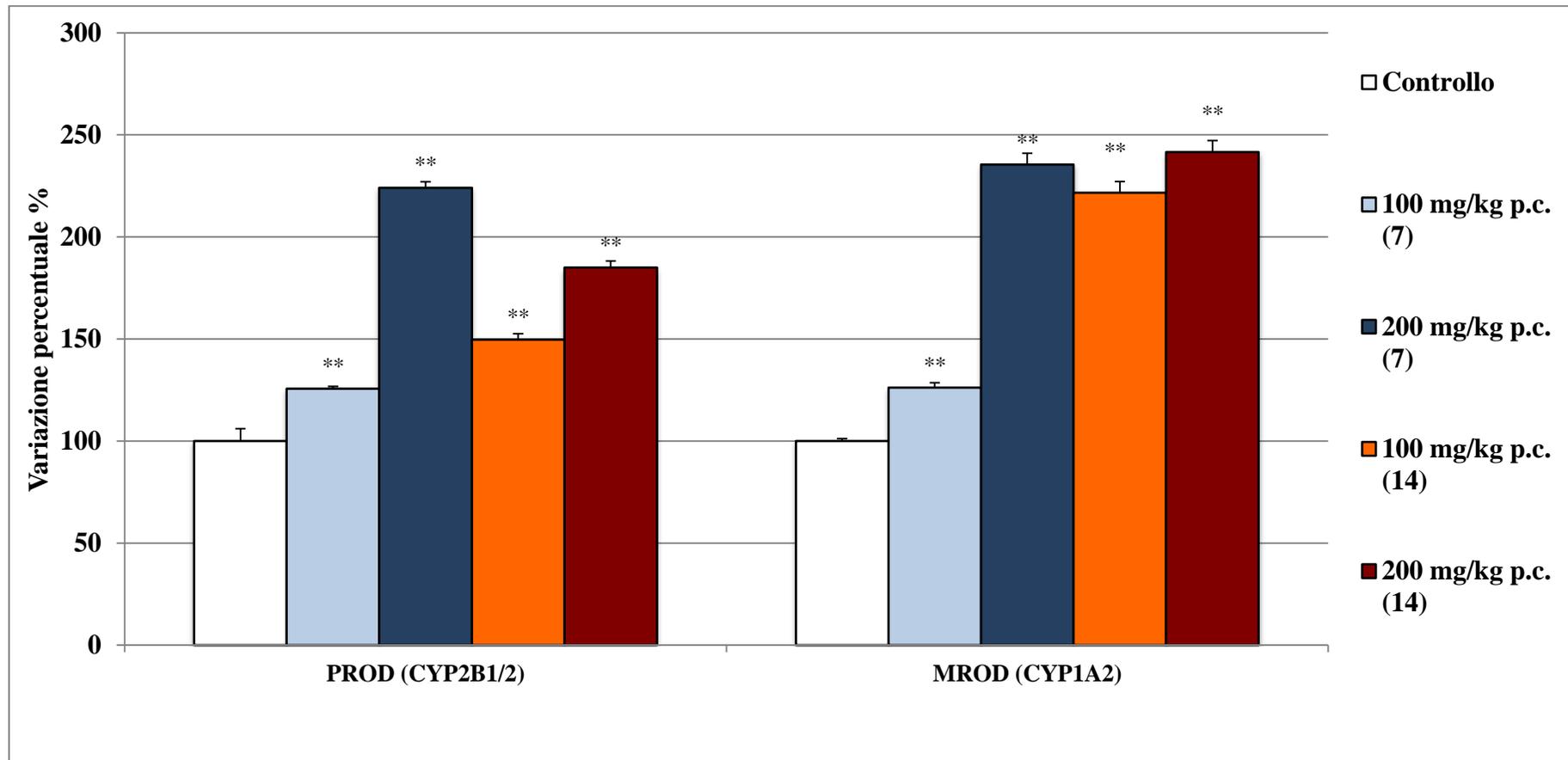
La somministrazione di Vitamina E per sette giorni ha provocato una crescita significativa dei livelli di mRNA di circa il 30% ($p < 0.01$), solo negli animali trattati con dose minima. Al contrario, il trattamento prolungato per quattordici giorni mostra una più marcata induzione, con valori che superano, per entrambe le dosi, il 50% ($p < 0.001$).

Tabella 4.4. Effetti della vitamina E sul sistema monoossigenasico P450 dipendente in prostata

Parametri	Controllo	Trattamento (sette giorni)		Trattamento (quattordici days)	
		100 mg/kg p.c	200 mg/kg p.c.	100 mg/kg p.c.	200 mg/kg p.c.
Pentoxoresorufin <i>O</i> -dealkylase (pmol × mg ⁻¹ × min ⁻¹) (CYP2B1/2)	1.33±0.08	1.67±0.02**	2.98±0.23**	1.99±0.06**	2.46±0.08**
Methoxyresorufin <i>O</i> -demethylase (pmol × mg ⁻¹ × min ⁻¹) (CYP1A2)	0.65±0.11	0.82±0.02**	1.53±0.09**	1.44±0.08**	1.57±0.09**

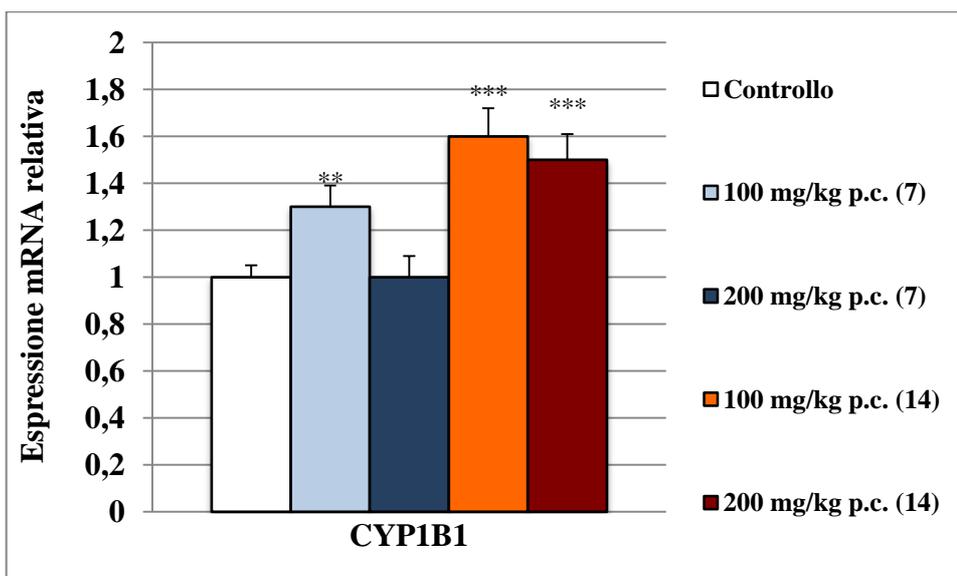
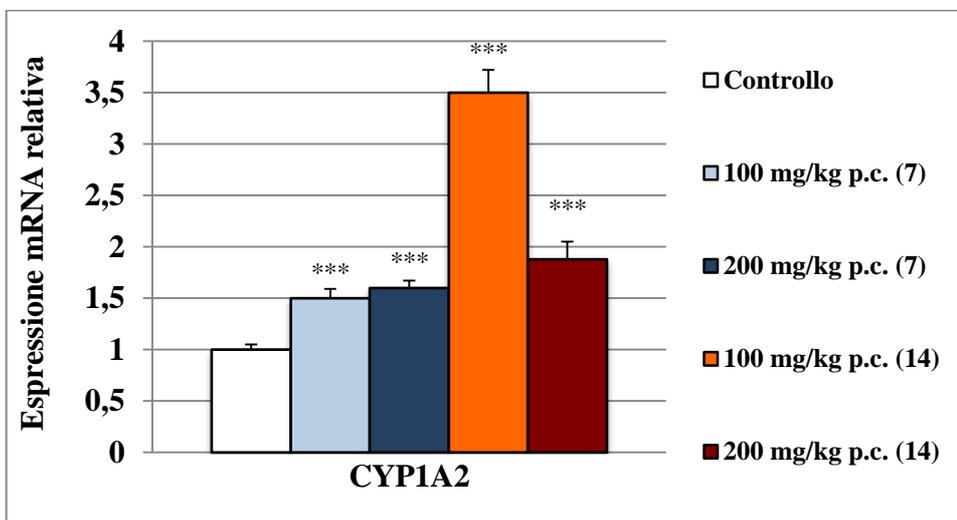
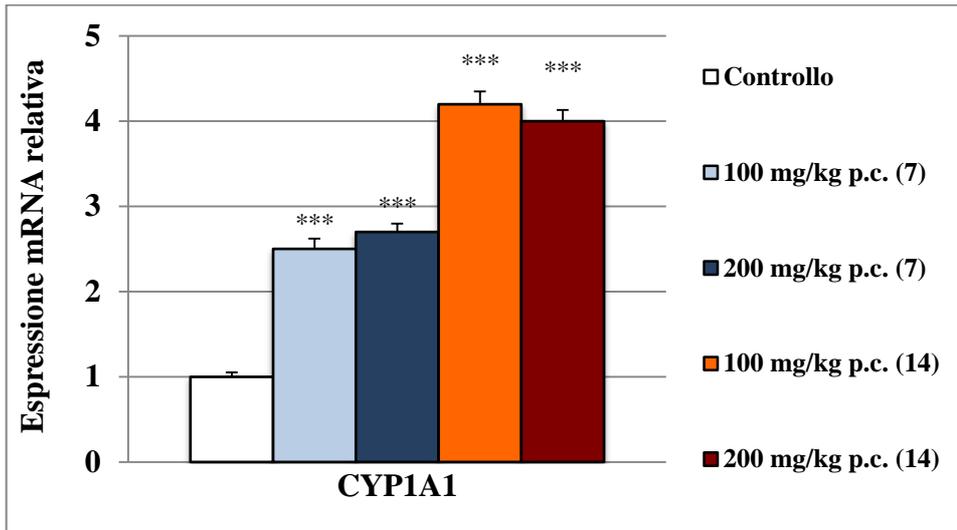
I risultati sono la media ± deviazione standard (S.D.) di sei esperimenti indipendenti eseguiti su sei differenti animali. * p<0.05 e ** p<0.01 rispetto al controllo, secondo il rank method di Wilcoxon.

Figura 4.3. Effetti della vitamina E sul sistema monoossigenasico P450 dipendente in prostata



Il grafico rappresenta la media \pm deviazione standard (S.D.) di sei esperimenti indipendenti eseguiti su sei animali * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ rispetto al controllo, secondo il test non parametrico di Wilcoxon.

Figura 4.4. Analisi dell'espressione genica mediante tecnica di RT-PCR



Il grafico rappresenta la media \pm deviazione standard (S.D.) di sei esperimenti indipendenti eseguiti su sei animali * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ rispetto al controllo, secondo ANOVA $n=6$

4.1.4. Enzimi epatici di fase II (GST UDPGT)

La Tabella 4.5 e la Figura 4.5. mostrano come il trattamento con vitamina E non abbia prodotto profonde modulazioni nell'attività degli enzimi coniugativi di fase II. La glutatione transferasi (GST) ha riportato deboli fluttuazioni, un calo di circa il 12% si è verificato dopo la somministrazione di 200 mg/kg p.c. per sette giorni ($p<0.01$), mentre, il trattamento a quattordici giorni, ha provocato un significativo ($p<0.01$) ma debole incremento.

L'UDPGT non ha riportato variazioni in seguito al trattamento, ad eccezione di un leggero aumento, circa 9%, registrato dopo la somministrazione della dose massima per sette giorni ($p<0.05$).

4.1.5. Enzimi di fase II (GST UDPGT) in rene

Contrariamente a quello che è stato osservato nel fegato, i test condotti sul tessuto renale mostrano inattivazioni importanti a carico degli enzimi di fase II.

GST ha riportato un'inattivazione in ciascun'unità sperimentale (da 16% $p<0.05$ a 28%; $p<0.01$). Il fenomeno viene esacerbato per l'UDPGT che ha mostrato marcate inattivazioni (da 47% fino a 57 %; $p<0.01$). I risultati sono mostrati in Tabella 4.6. e in Figura 4.6.

Tabella 4.5. Effetti della vitamina E sugli enzimi epatici di fase II (GST UDPGT)

Parametri	Controllo	Trattamento (sette giorni)		Trattamento (quattordici giorni)	
		100 mg/kg p.c.	200 mg/kg p.c.	100 mg/kg p.c.	200 mg/kg p.c.
Glutathione S-transferase (GST) ($\text{nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$)	11.01±0.18	10.73±0.73	9.71±0.18**	12.53±0.27**	11.76±0.19*
UDPglucuronosyl-transferase (UDPGT) ($\text{nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$)	4.46±0.32	4.03±0.24	4.94±0.13*	4.92±0.57	3.90±0.50

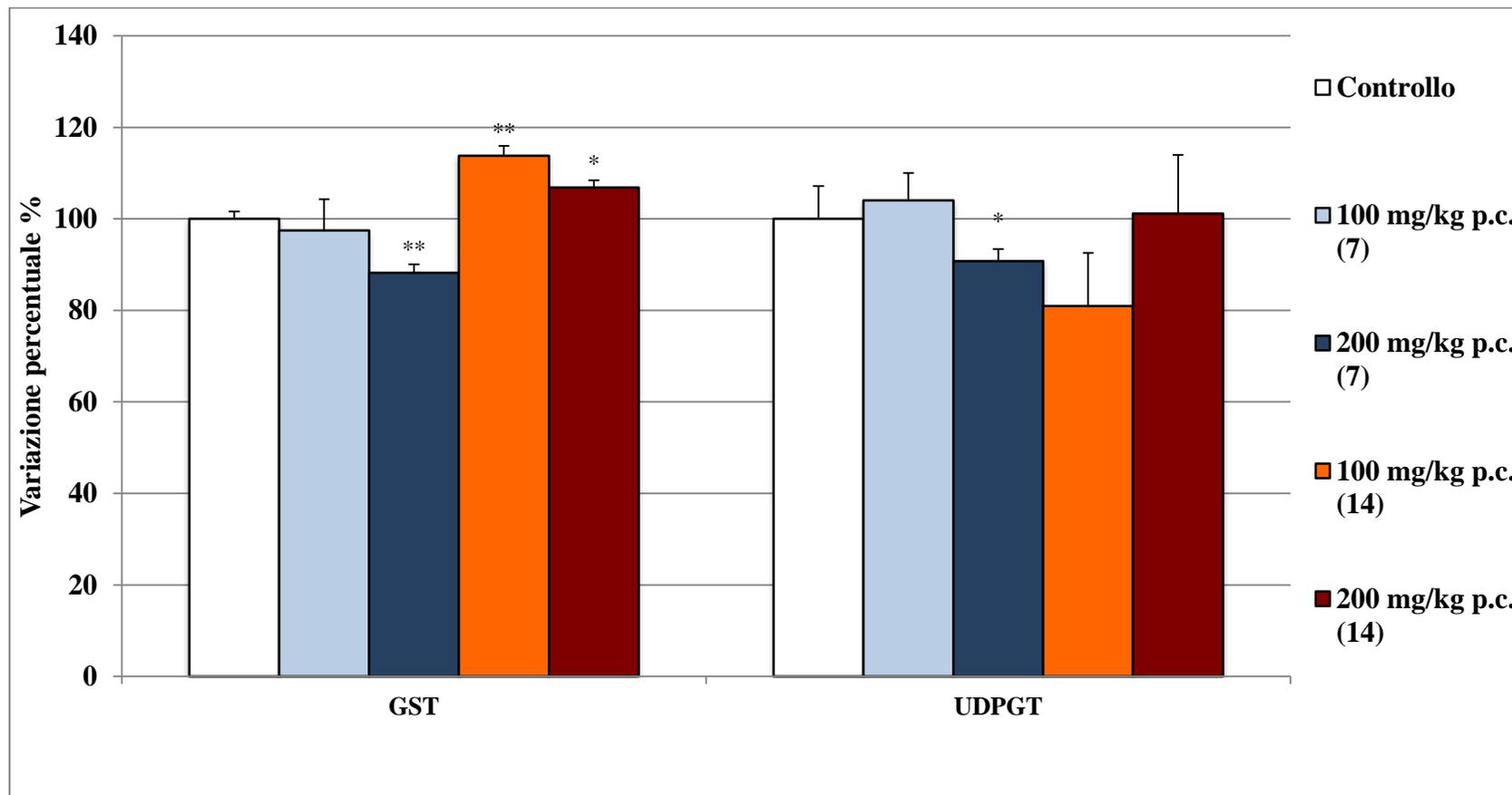
I risultati sono la media \pm deviazione standard (S.D.) di sei esperimenti indipendenti eseguiti su sei differenti animali. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ rispetto al controllo, secondo il rank method di Wilcoxon.

Tabella 4.6. Effetti della vitamina E sugli di fase II (GST UDPGT) in rene

Parametri	Controllo	Trattamento (sette giorni)		Trattamento (quattordici giorni)	
		100 mg/kg p.c.	200 mg/kg p.c.	100 mg/kg p.c.	200 mg/kg p.c.
Glutathione S-transferase (GST) ($\text{nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$)	0.32±0.01	0.23±0.01**	0.27±0.01**	0.26±0.01**	0.25±0.01**
UDPglucuronosyl-transferase (UDPGT) ($\text{nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$)	1.19±0.06	0.51±0.06**	0.54±0.07**	0.63±0.11**	0.63±0.02**

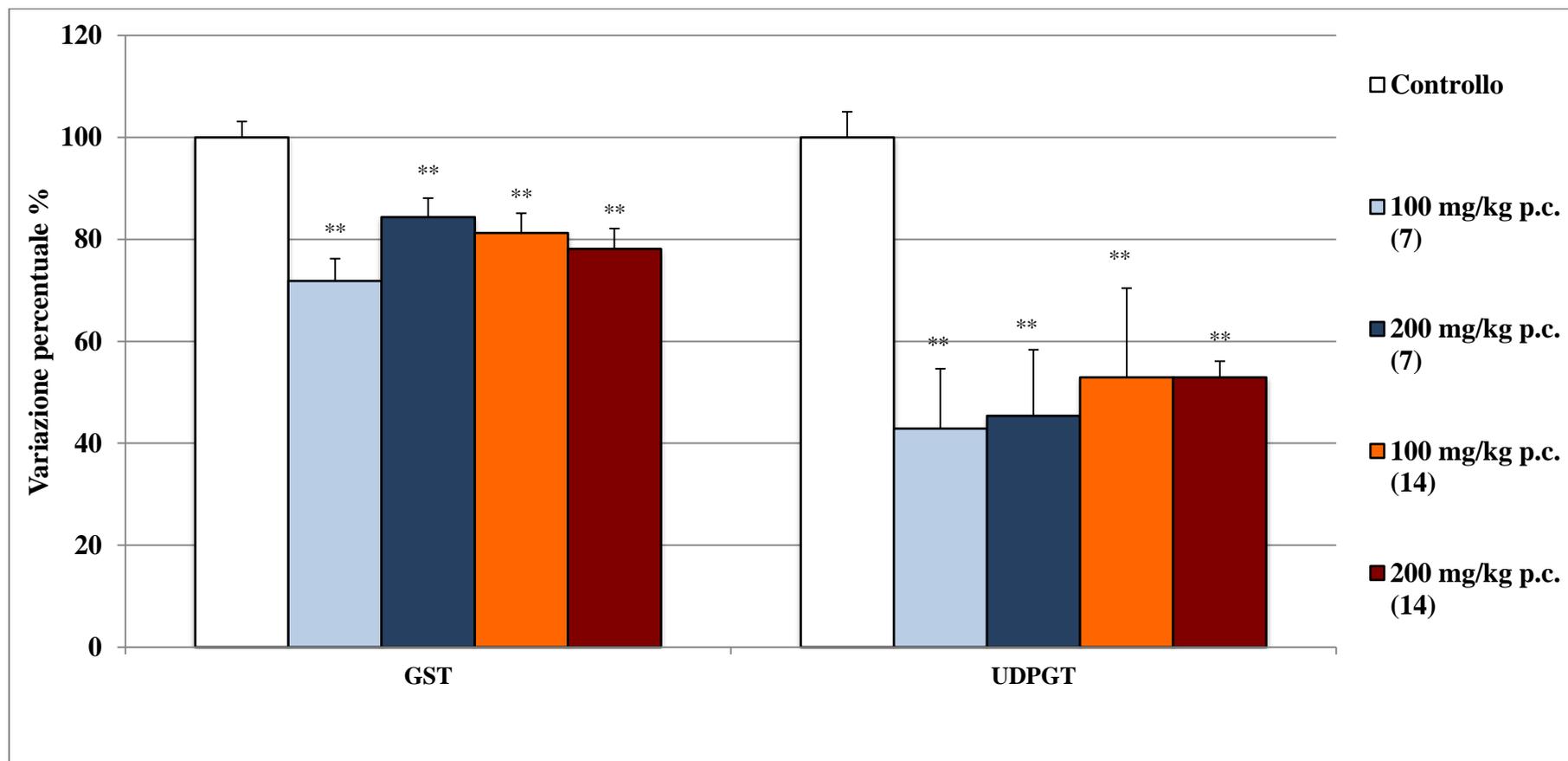
I risultati sono la media \pm deviazione standard (S.D.) di sei esperimenti indipendenti eseguiti su sei differenti animali. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ rispetto al controllo, secondo il rank method di Wilcoxon.

Figura 4.5. Effetti della vitamina E sugli enzimi epatici di fase II (GST UDPGT)



Il grafico rappresenta la media \pm deviazione standard (S.D.) di sei esperimenti indipendenti eseguiti su sei animali * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ rispetto al controllo, secondo il test non parametrico di Wilcoxon.

Figura 4.6. Effetti della vitamina E sugli enzimi di fase II (GST UDPGT) in rene



Il grafico rappresenta la media \pm deviazione standard (S.D.) di sei esperimenti indipendenti eseguiti su sei animali * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ rispetto al controllo, secondo il test non parametrico di Wilcoxon.

4.2. Enzimi antiossidanti

4.2.1. Enzimi antiossidanti epatici

Come si può apprezzare dalla Tabella 4.7. e dalla Figura 4.7., la somministrazione di 100 mg/kg p.c. per sette o quattordici giorni ha determinato un modesto incremento dell'attività associata all'enzima catalasi (CAT). I risultati riportano un aumento di circa il 73% dopo sette giorni di trattamento, e di 53% al quattordicesimo giorno ($p < 0.01$).

Il gruppo sperimentale trattato con dose massima (200 mg/kg p.c.) per sette giorni hanno mostrato una modulazione enzimatica complessa, riportando un significativo innalzamento dell'attività enzimatica, che tuttavia, si presenta inferiore in valore assoluto, rispetto al valore ottenuti con la dose minima (20% a sette giorni di trattamento; $p < 0.01$), mentre, al contrario, negli animali ai quali il trattamento è stato prolungato fino a quattordici giorni, si è osservata una riduzione di circa il 28% dell'efficienza catalitica ($p < 0.01$).

La DT-diaforasi è stata significativamente indotta ($p < 0.01$), dopo sette o quattordici giorni di somministrazione con dose massima.

4.1.3. Enzimi antiossidanti in rene

Le analisi condotte su frazioni subcellulari di rene, hanno prodotto risultati che tracciano un profilo molto lontano da quello osservato e descritto precedentemente per il fegato.

Inattivazioni che oscillano dal 20% fino al 44%, hanno interessato l'attività della DT-diaforasi in ciascun gruppo di trattamento ($p < 0.01$). La catalasi, ha riportato una leggera crescita dell'attività catalitica rispetto al gruppo di controllo dopo somministrazione di 100 mg/kg p.c. per sette giorni consecutivi (20%; $p < 0.01$), mentre al contrario, una riduzione è stata registrata nel gruppo sperimentale trattato con dose massima per quattordici giorni ($p < 0.01$). I dati sperimentali sono riportati in Tabella 4.8. e in Figura 4.8.

Tabella 4.7. Effetti della vitamina E sugli enzimi antiossidanti epatici

Parametri	Controlli	Trattamento (sette giorni)		Trattamento (quattordici)	
		100 mg/kg p.c.	200 mg/kg p.c.	100 mg/kg p.c.	200 mg/kg p.c.
Catalase ($\mu\text{mol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$)	3.47±0.33	6.00±0.56**	4.18±0.44*	5.41±0.65**	2.49±0.21**
DT-diaforase ($\mu\text{mol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$)	8.73±0.50	8.37±0.90	13.31±1.50**	9.51±1.13**	10.72±1.19**

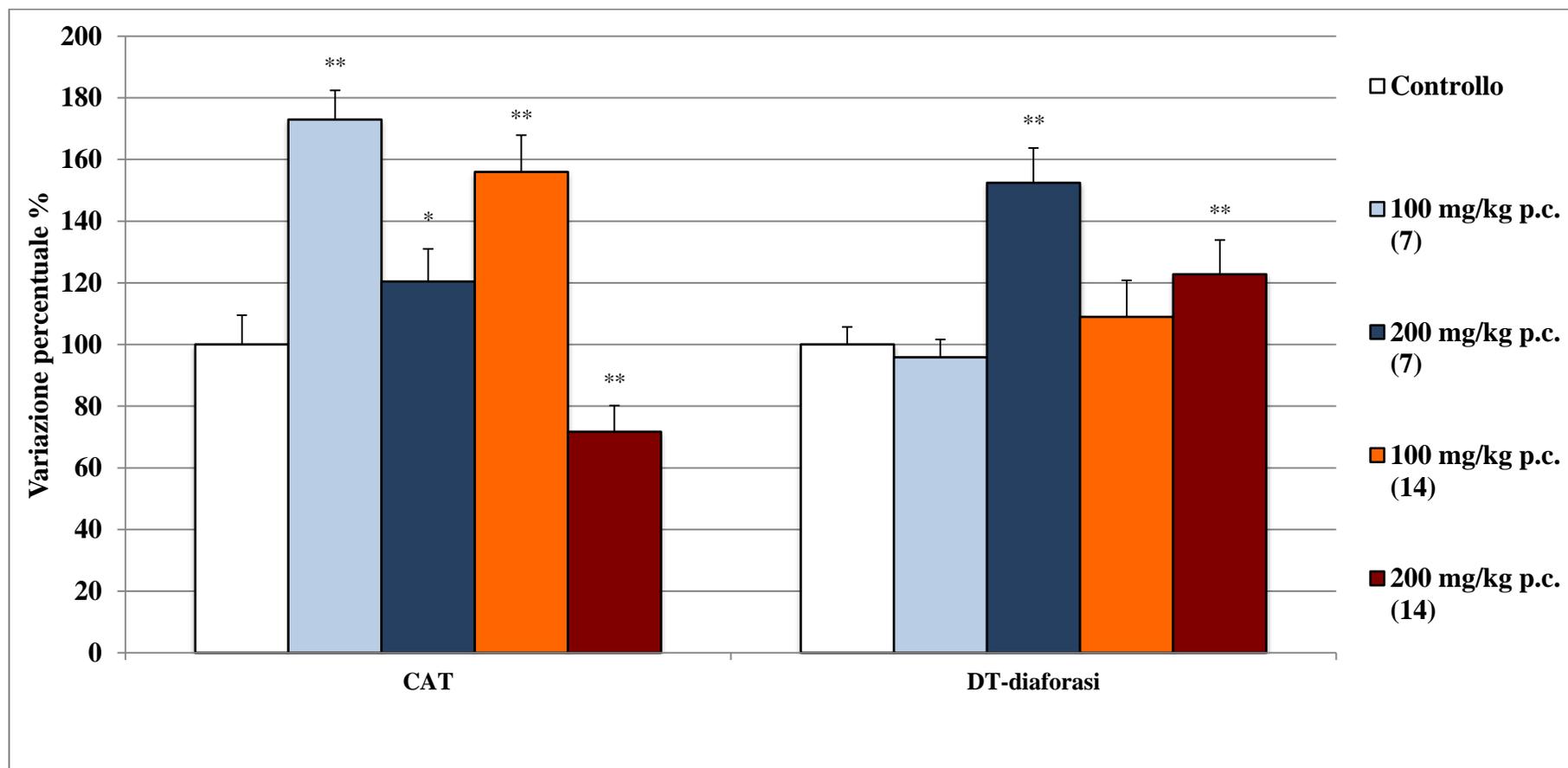
I risultati sono la media \pm deviazione standard (S.D.) di sei esperimenti indipendenti eseguiti su sei differenti animali. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ rispetto al controllo, secondo il rank method di Wilcoxon.

Tabella 4.8. Effetti della vitamina E sugli enzimi antiossidanti in rene

Parameters	Controls	Treatment (seven days)		Treatment (fourteen days)	
		100 mg/kg b.w	200 mg/kg b.w	100 mg/kg b.w	200 mg/kg b.w
Catalase ($\mu\text{mol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$)	6.36±0.18	7.60±0.87**	6.96±0.37*	6.37±0.19	5.64±0.17**
NAD(P)H:quinone reductase ($\mu\text{mol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$)	3.40±0.14	2.52±0.30**	2.54±0.24**	2.72±0.18*	1.92±0.11**

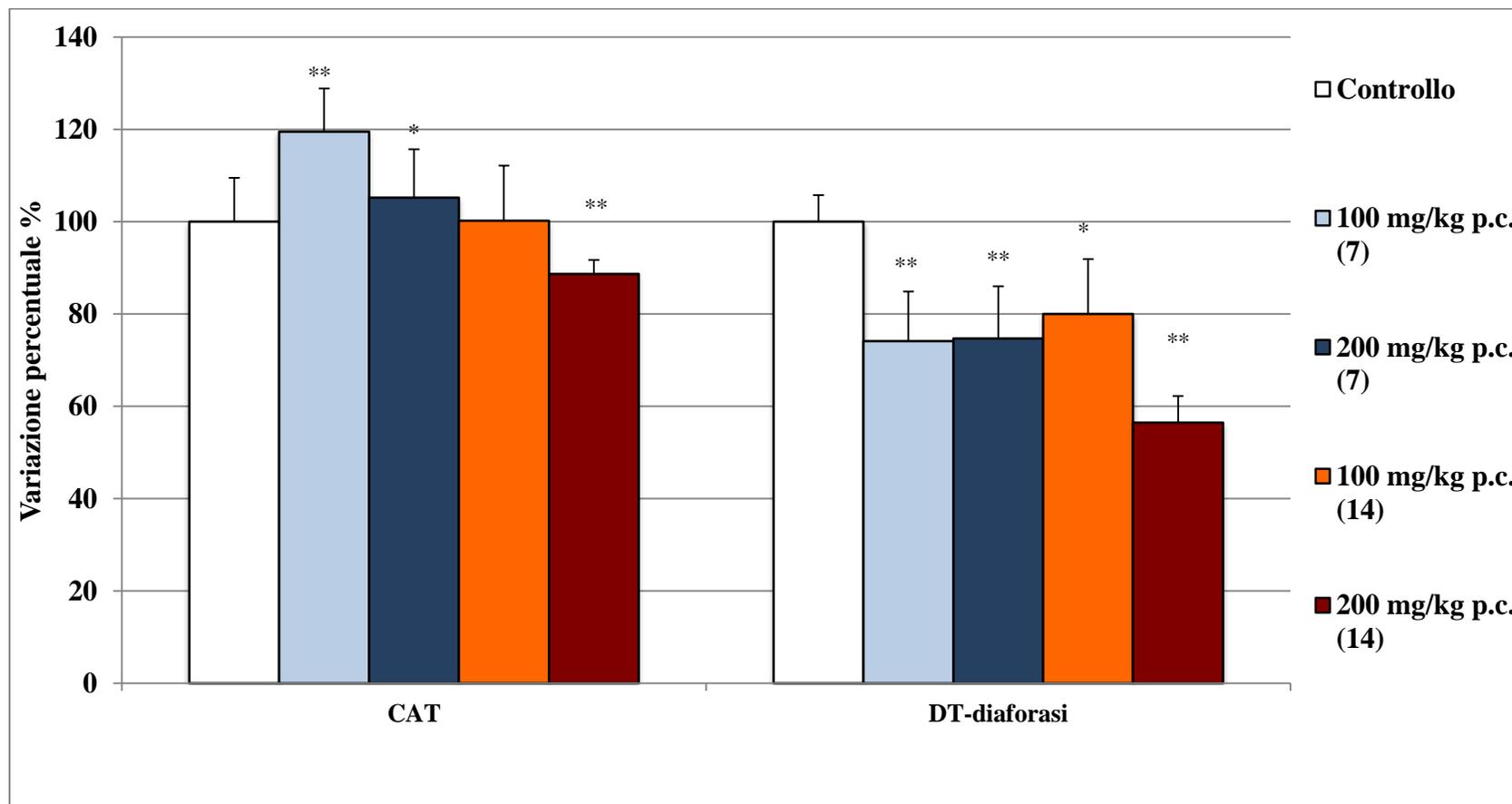
I risultati sono la media \pm deviazione standard (S.D.) di sei esperimenti indipendenti eseguiti su sei differenti animali. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ rispetto al controllo, secondo il rank method di Wilcoxon.

Figura 4.7. Effetti della vitamina E sugli enzimi antiossidanti epatici



Il grafico rappresenta la media \pm deviazione standard (S.D.) di sei esperimenti indipendenti eseguiti su sei animali * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ rispetto al controllo, secondo il test non parametrico di Wilcoxon.

Figura 4.8. Effetti della vitamina E sugli enzimi antiossidanti in rene



Il grafico rappresenta la media \pm deviazione standard (S.D.) di sei esperimenti indipendenti eseguiti su sei animali * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ rispetto al controllo, secondo il test non parametrico di Wilcoxon.

4.3. Effetti della vitamina E sullo stato stress ossidativo (OSS)

E' stata utilizzata la tecnica del radical trapping (EPR) per analizzare il livello di radicali liberi presenti nel tessuto in esame.

4.3.1. OSS nel rene

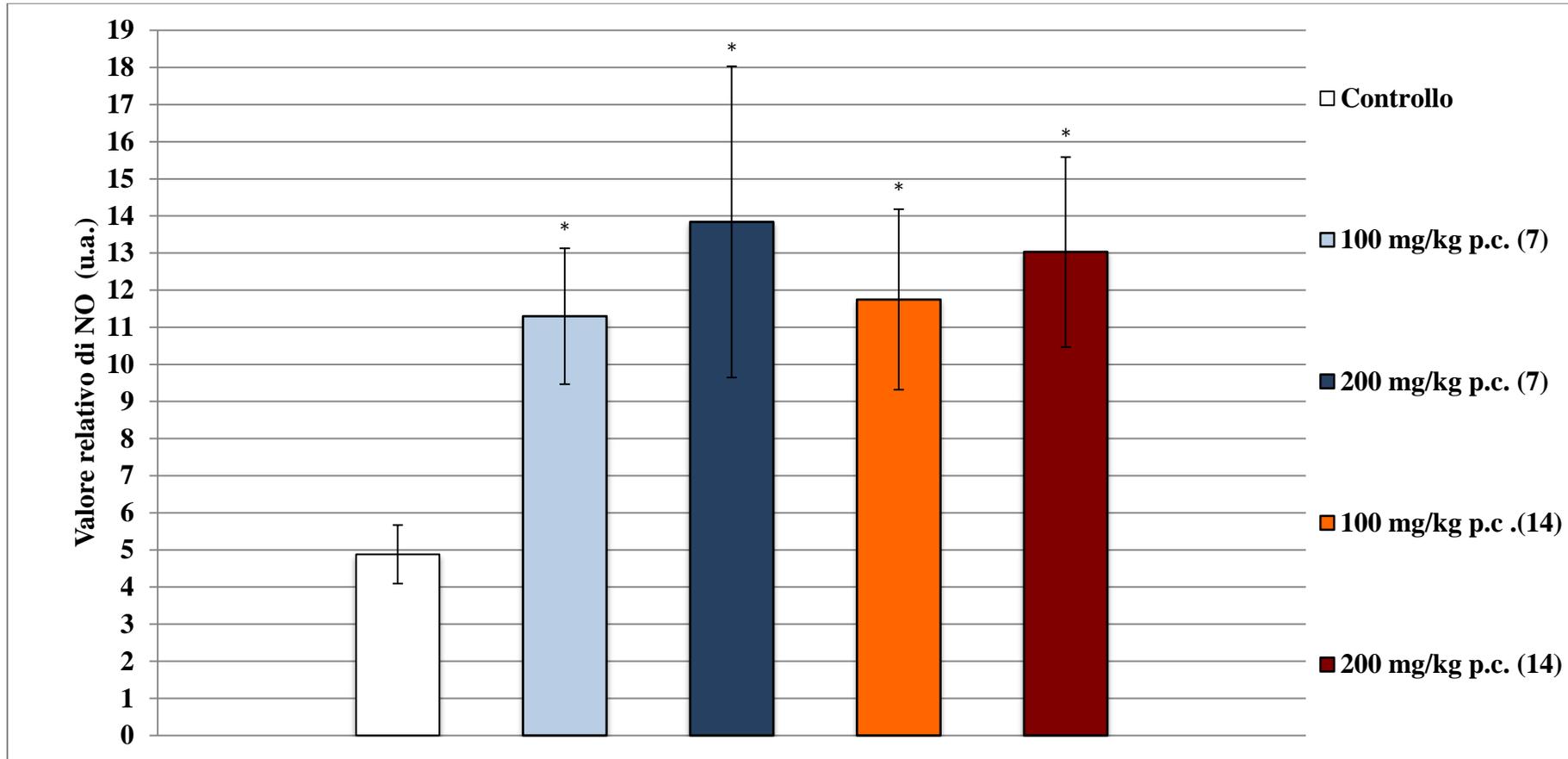
Come si può apprezzare dalla Figura 4.9. il tessuto di rene provenienti dai ratti trattati con vitamina E, ha riportato un generale e marcato aumento dell'OSS rispetto al gruppo di controllo.

Ciascun gruppo sperimentale ha mostrato un raddoppio dei valori relativi (OSS) rispetto ai livelli registrati nel tessuto degli animali di controllo ($p < 0.05$).

4.3.2. OSS nella prostata

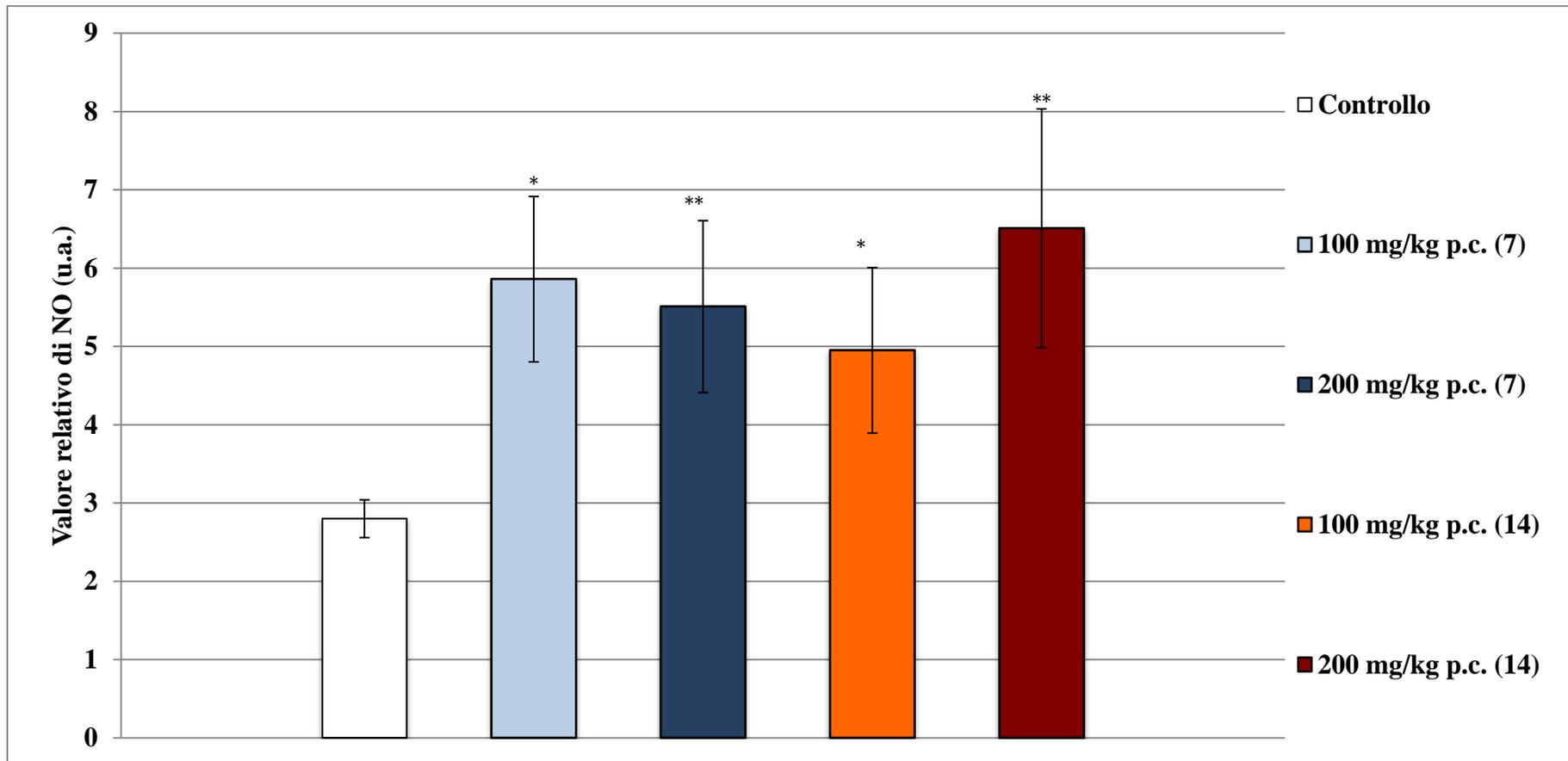
I valori ottenuti su tessuto prostatico sono in linea con i risultati ottenuti nel rene. Anche nella prostata si è verificato un chiaro fenomeno di over-produzione di radicali liberi in seguito a trattamento con vitamina E. Lo OSS è raddoppiato in tutti i gruppi sperimentali ($p < 0.01$) ad eccezione del gruppo trattato con la dose minima per quattordici giorni, che ha riportato un incremento leggermente inferiore (circa 77%; $p < 0.01$). I risultati sono riportati in Figura 4.10.

Figura 4.9. OSS in rene



Il grafico rappresenta la media \pm deviazione standard (S.D.) di sei esperimenti indipendenti eseguiti su sei frammenti di tessuto * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ rispetto al controllo, secondo t test per dati non accoppiati (due code).

Figura 4.10. OSS in prostata



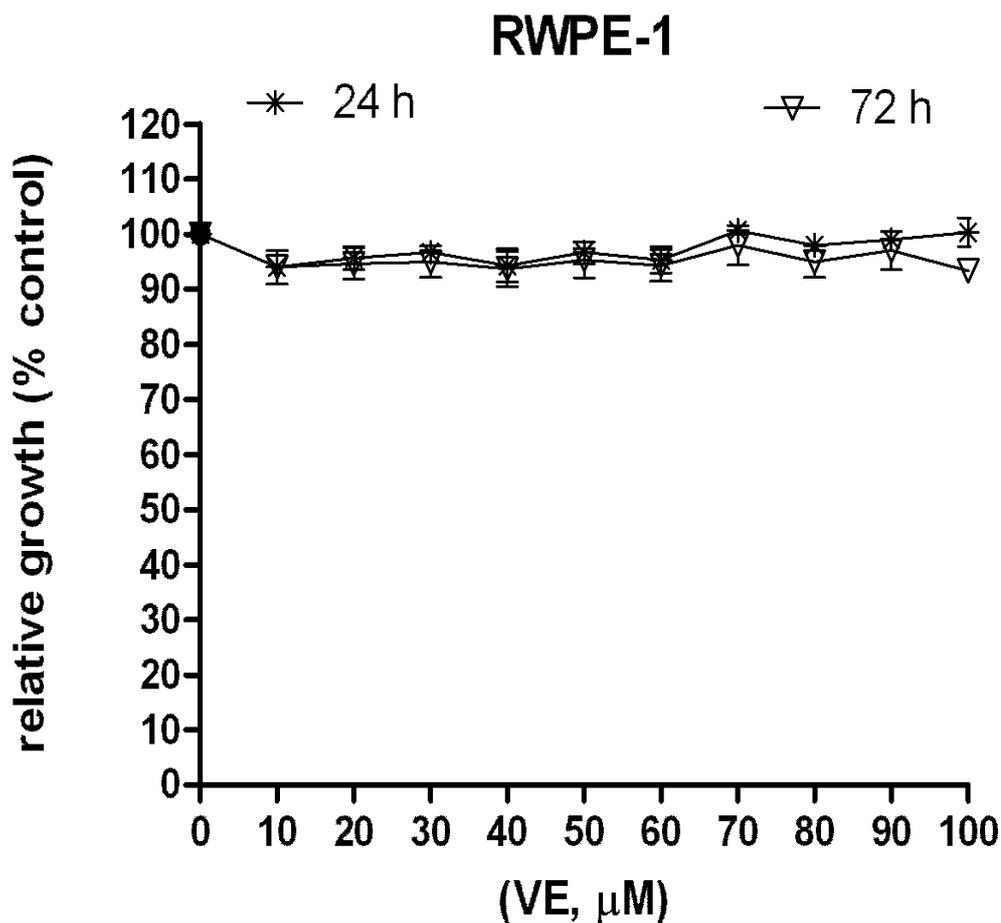
Il grafico rappresenta la media \pm deviazione standard (S.D.) di sei esperimenti indipendenti eseguiti su sei frammenti di tessuto * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ rispetto al controllo, secondo t test per dati non accoppiati (due code).

4.4. Effetti della vitamina E sulle cellule RWPE-1 di epitelio di prostata umana.

4.4.1. Test di vitalità cellulare mediante sulforodamina B (SRB)

Le cellule trattate con vitamina E a concentrazioni scalari (da 20 μ M fino a 100 μ M), per 24 o 72 ore, non mostrano una riduzione significativa della vitalità come si può osservare dalla Figura 3.10.

Figura 4.11. Test di vitalità cellulare mediante sulforodamina B (SRB).

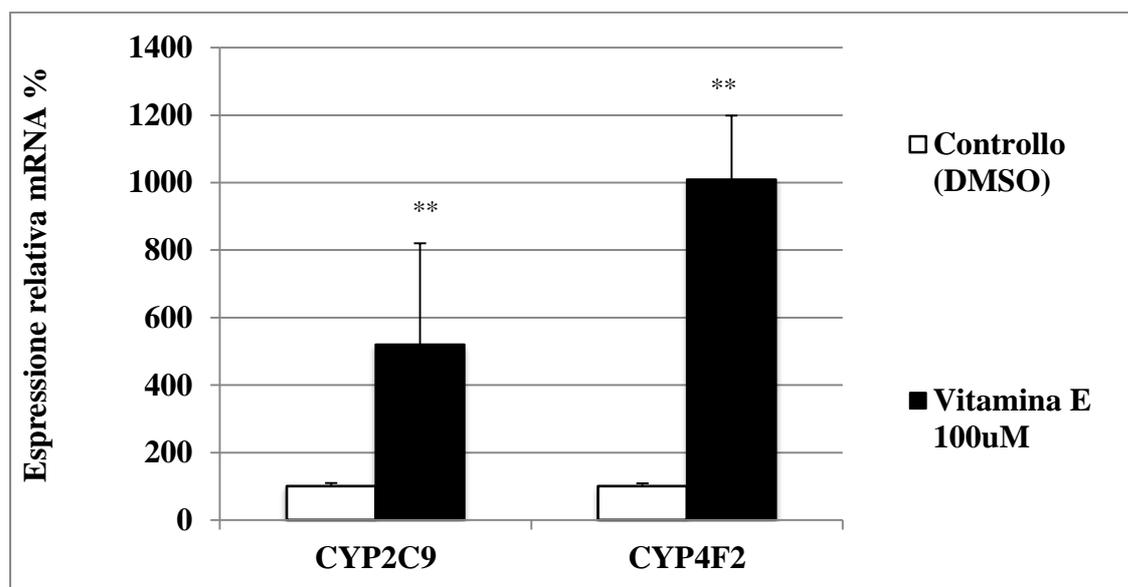
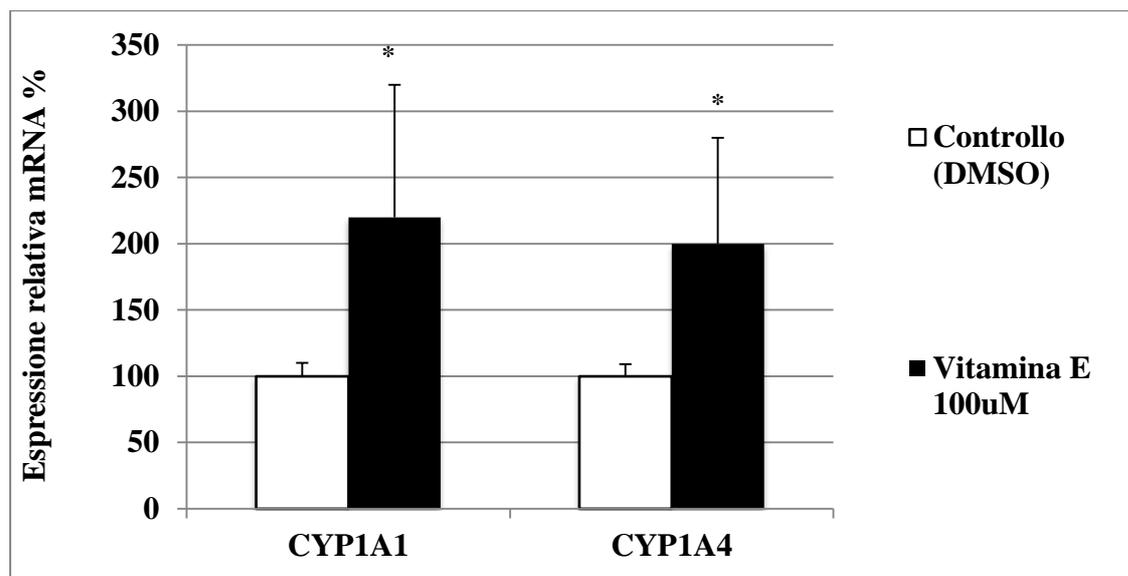


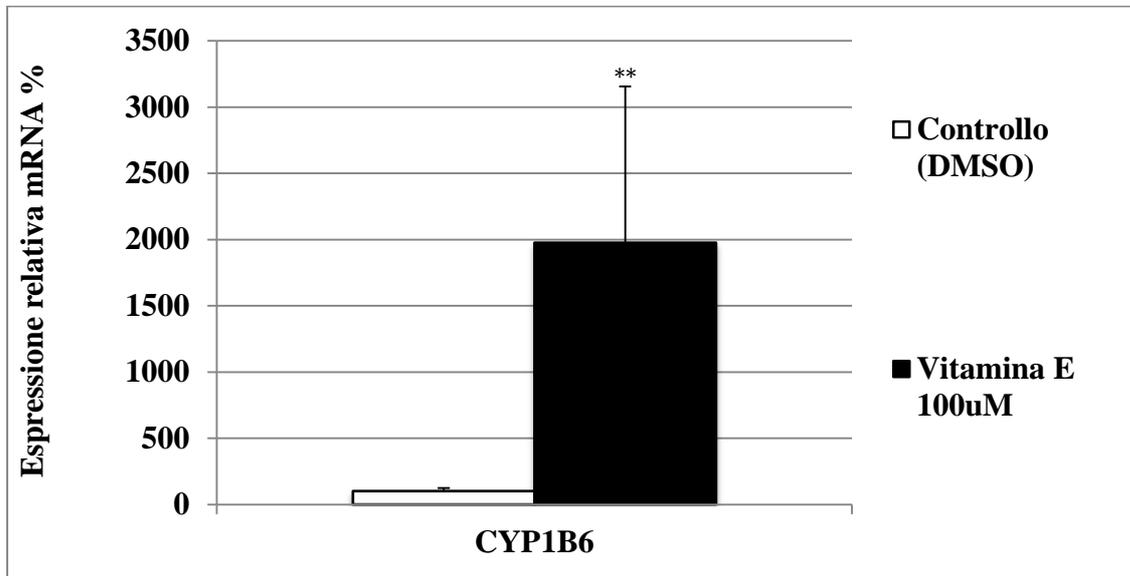
Il grafico rappresenta la media \pm deviazione standard (S.D.) di tre esperimenti indipendenti eseguiti in triplicato * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ rispetto al controllo, secondo ANOVA, $n=3$.

4.4.2. Effetti della vitamina E sull'espressione genica di alcune isoforme del citocromo P450 (CYP) in cellule RWPE-1 di epitelio di prostata umana esposte alla concentrazione di 100 μ M per 48 ore

L'analisi dell'espressione genica mostra come la vitamina E abbia provocato una profonda modulazione nell'espressione dell'mRNA delle isoforme indagate. Le isoforme CYP1A1 e CYP1A4 mostrano entrambe un incremento del 100% ($p < 0.05$), mentre CYP2C9 e CYP4F2 hanno riportato induzioni più marcate 420% e 910% rispettivamente ($p < 0.01$). L'esposizione a vitamina E aumenta di oltre 19 volte l'espressione dell'mRNA relativo all'isoforma CYP1B6 rispetto al controllo ($p < 0.05$).

Figura 4.12. Analisi dell'espressione genica su cellule REPW-1 mediante RT-PCR



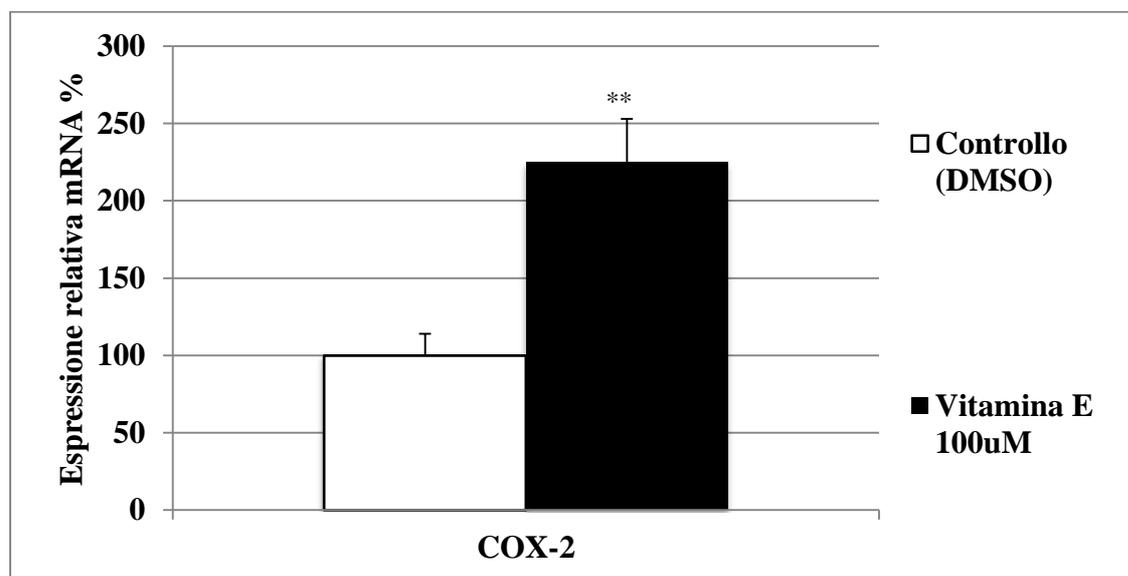
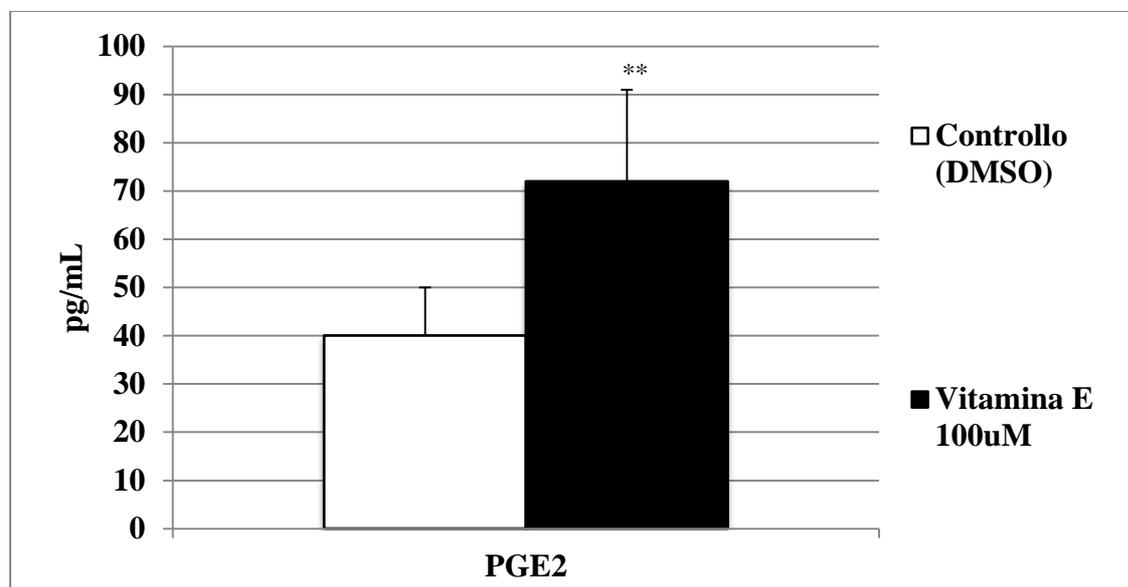


I grafici rappresentano la media \pm deviazione standard (S.D.) di tre esperimenti indipendenti eseguiti in triplicato * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ rispetto al controllo, secondo ANOVA, $n=3$.

4.4.3. Effetti della vitamina E su prostaglandina E₂ (PGE₂) e cicloossigenasi-2 (COX-2) in cellule RWPE-1 di epitelio di prostata umana esposte alla concentrazione di 100μM per 48 ore

Come si può osservare dalla Figura 4.13, i grafici mostrano un netto aumento della PGE₂ e della COX-2 in seguito ad esposizione con vitamina E. La COX-2 mostra un raddoppio in termini di espressione dell'mRNA rispetto al controllo ($p < 0.01$). La PGE₂, misurata come pg/mL di soprannatante cellulare, riporta un valore basale (controllo) di circa 40 pg/mL, l'esposizione a vitamina E, ha determinato un aumento di oltre 30 pg/mL ($p < 0.01$)

Figura 4.13. Effetti della Vitamina E sull'espressione della prostaglandina E₂ (PGE₂) e cicloossigenasi-2 (COX-2) in cellule RWPE-1 trattate con VE (100μM per 48 ore)



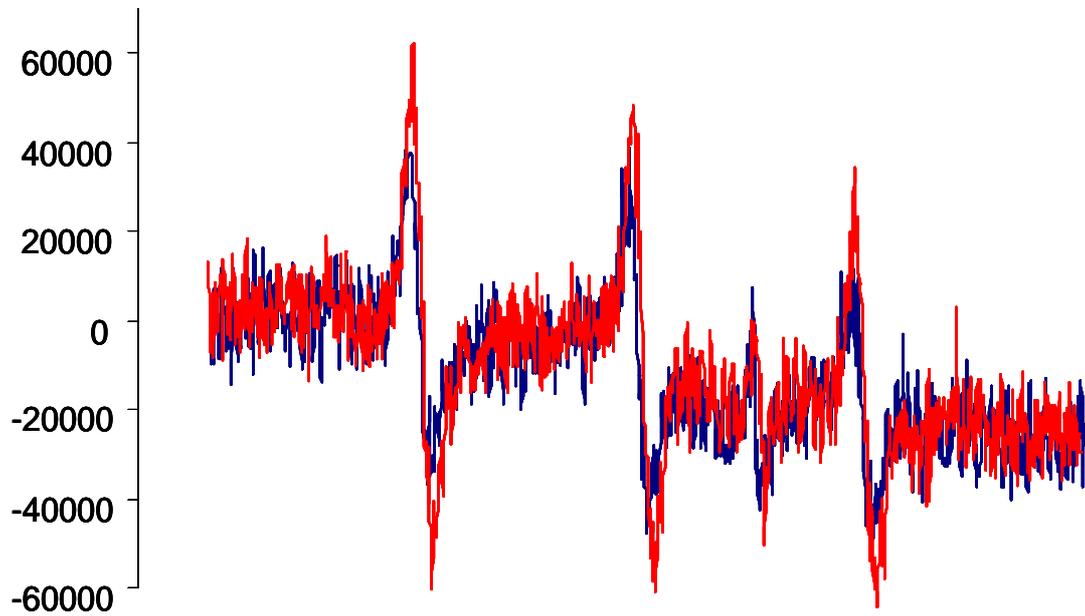
I grafici rappresentano la media \pm deviazione standard (S.D.) di tre esperimenti indipendenti eseguiti in triplicato * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ rispetto al controllo, secondo ANOVA, $n=3$.

4.4.4. OSS in cellule RWPE-1 trattate con vitamina E (100 μ M per 48 ore)

La Figura 3.12. raffigura compara lo spettro EPR ottenuto in cellule RWPE-1 esposte a Vitamina E per 48 ore. Lo spettro di riferimento è stato ottenuto da cellule esposte al solo veicolo (DMSO). L'immagine è rappresentativa di tre esperimenti indipendenti.

Come si può notare, la prima linea dello spettro, delinea una netto aumento del radicale nitrossido (NO) nelle cellule trattate rispetto al controllo. Il rapporto di intensità tra le oscillazioni della prima riga dello spettro è stata determinata (>1.7).

Figura 4.14. Spettro EPR ottenuto da cellule RWPE-1 trattate con vitamina E (100 μ M per 48 ore).



La Figura rappresenta lo spettro EPR dell'analisi condotta su cellule RWPE-1 esposte a vitamina E (rosso), il controllo (blu) è stato esposto al solo veicolo (DMSO). La Vitamina E è stata addizionata al mezzo di coltura alla concentrazione di 100 μ M. Il trattamento è stato di 48 ore.

5. Discussione

Lo studio condotto sul modello animale ha mostrato come la vitamina E (VE), sia in grado di provocare modulazioni significative a carico degli enzimi del *drug-metabolism*, e degli enzimi antiossidanti. La capacità da parte della VE di alterare l'espressione genica di alcune isoforme del citocromo P450 nei vari tessuti e di conseguenza, l'attività catalitica associata, è stato un risultato ipotizzato nel "piano di analisi" del progetto di ricerca. La letteratura scientifica, infatti, riporta come la somministrazione di VE in ratto, correli con un aumento del contenuto epatico di CYP450 e di NADPH-citocromo P450-reduttasi (Murray M. et al., 1991), così come, alcune isoforme specifiche quali CYP2C11, CYP3A11, CYP3A4, CYP3A5, e altre appartenenti alla famiglia CYP1 e CYP2 (Brigelius-Flohè R., 2003; Sidorova Y. A. et al., 2003; Mustatich D.J. et al., 2009). Ciò che più sorprende, sono le differenti risposte ottenute in seguito a trattamento con VE nei diversi organi, con particolare riferimento alla prostata.

Osservando i risultati inerenti agli enzimi di fase I e II in fegato, appare come la VE abbia esercitato un effetto pressoché neutro. Le modulazioni significative riportate, non sono di magnitudo tale da poter rappresentare un reale rischio tossicologico. Inoltre, l'apprezzabile aumento del macchinario antiossidante considerato nel presente studio (Catalasi e DT-diaforasi), sembrerebbe confermare alla VE, in termini di chemioprevenzione classica, l'etichetta di "agente protettivo", così com'è considerata, da un'ampia parte della comunità scientifica (Hathcock J.N. et al., 2005).

Tuttavia, se si considerano i dati provenienti dalle analisi condotte su rene e prostata, lo scenario che si traccia appare molto lontano da quello osservato per il tessuto epatico. Il trattamento con VE ha determinato negli organi sopracitati ad un preciso

effetto induttivo degli enzimi bioattivanti i cancerogeni (fase I), e tale fenomeno, estrapolato all'uomo, costituirebbe un serio rischio tossicologico.

E' ben noto come gli enzimi del metabolismo degli xenobiotici possano essere indotti da una vasta varietà di composti chimici come farmaci, pesticidi, inquinanti ambientali, additivi alimentari, ma anche da fitochimici e micronutrienti (Grahama M.J. et al., 2008). Tali enzimi, sono alla base di quel complesso sistema di reazioni metaboliche che ha principalmente lo scopo di trasformare gli xenobiotici in prodotti maggiormente idrofili e di conseguenza più facilmente eliminabili via escrezione, al fine di ridurre l'esposizione dell'organismo a sostanze esogene potenzialmente dannose. E' quindi ben comprensibile che l'espressione di tale sistema enzimatico sia facilmente modulabile, per fronteggiare al meglio le necessità a cui l'organismo può incorrere nel tempo.

E' necessario considerare, che, il sistema monoossigenasico 450-dipendente è strettamente legato anche ad alcuni aspetti del metabolismo endogeno, come ad esempio il metabolismo del colesterolo, la sintesi di ormoni steroidei e di ossido nitrico, o il metabolismo della vitamina D e dei derivati dell'acido arachidonico. Inoltre, esso è coinvolto nella crescita e differenziazione cellulare, nell'apoptosi, e in funzioni endocrine (Orellana M. et al., 2004). Se quindi da un lato, importanti modulazioni del sistema CYP possano costituire un fonte di squilibrio per il metabolismo endogeno, dall'altro, è noto come le reazioni ossidative associate al CYP450 possano bioattivare pro-mutageni e pro-cancerogeni, saturando gli enzimi del riparo del DNA, che risulta quindi esposto maggiormente al rischio di danno strutturale (Guengerich F.P. et al., 2006).

Le marcate induzioni registrate a carico delle isoforme CYP1A1, CYP1A2, e CYP1B1/2 e in rene e prostata sono di particolare importanza se si considera che

molti inquinanti ambientali e agenti chimici, come ad esempio i ben noti idrocarburi policiclici aromatici (PHA), agiscono come mutageni e cancerogeni in seguito alla loro bioattivazione ad opera della famiglia CYP1 (Schimida T. et al., 2004).

Inoltre, è stato dimostrato come ad un aumento della attività catalitica del CYP2E1 sia correlato un incremento della produzione delle specie reattive incentrate sull'ossigeno (ROS) (O_2^- , H_2O_2 , and HO^\cdot) (Bast A. et al., 1986), e ulteriori studi hanno chiarito come l'induzione di tutte le famiglie del P450 sia sempre associata ad aumento della produzione di radicali liberi (Paolini et al., 1996).

Nel discutere le implicazioni legate ad un incremento dell'attività CYP-correlata, è importante considerare i possibili effetti che tale fenomeno potrebbe assumere in concomitanza di polimorfismi genetici che possono influenzare l'attività metabolica degli enzimi del *drug-metabolism* (Nebert D.W., 1991; Rodriguez-Antona et al., C. et al., 2010), o che inibiscono marcatamente i meccanismi di detossificazione o di riparo del DNA (McIlwain C.C. et al., 2006 Wolfe K.J. et al., 2007 Sergentanis T.N. et al., 2010). Per esempio, considerando l'incremento osservato nel rene per l'attività enzimatica associata all'isoforma CYP2E1, è plausibile ipotizzare che il fenomeno potrebbe risultare ulteriormente più marcato in un individuo facente uso regolare di alcool. L'etanolo, che è esso stesso un noto induttore dell'isoforma CYP2E1, potrebbe innescare un effetto additivo o addirittura sinergico, con la VE senza contare, che come accennato precedentemente, la presenza di polimorfismi genetici, può ulteriormente complicare il quadro (Zanger U.M. et al., 2013).

E' stato inoltre dimostrato come il CYP2E1 sia una delle isoforme più attive nel generare ROS, costituendo un fattore di rischio per la progressione tumorale e la metastatizzazione (Hodges N.J. et al., 2007); recenti evidenze, sembrerebbero supportare l'ipotesi che una sovra-espressione del CYP2E1, e il relativo stress

ossidativo derivante dai ROS prodotti in eccesso, osservato in cellule tumorali mammarie MCF-10, possa contribuire a spiegare, la connessione tra il consumo di alcool e l'aumento del rischio di cancro alla mammella (León-Buitimea A. et al., 2012).

La modulazione in senso positivo registrata in rene e prostata (co-cancerogenesi), per le isoforme CYP1A1, 1A2, 2B1, e 1B1, potrebbe costituire un importante fattore di rischio aggiuntivo per i fumatori, che, essendo esposti giornalmente ad una vasta gamma di molecole pre-cancerogene che vengono attivate prevalentemente dalle isoforme indicate, senza contare il fatto, che diversi idrocarburi policiclici aromatici, sono essi stessi dei forti induttori del CYP (Elsherbiny M.E. et al., 2011). Recentemente, è stato riconosciuto un nuovo meccanismo secondo cui il CYP può interferire con il processo di cancerogenesi e con la proliferazione cellulare nei tessuti sensibili agli estrogeni, come la mammella e le ovaie (Go R.E. et al., 2015).

Da sempre gli estrogeni come il 17β -estradiolo ed estriolo, sono stati correlati con un aumento dell'incidenza di tumori alla mammella e all'utero. Nonostante il meccanismo maggiormente coinvolto nella progressione tumorale mediata da estrogeni sia dovuto all'interazione con il recettore per gli estrogeni ER, che può mediare l'espressione di diversi geni coinvolti nella proliferazione cellulare (Lee H.R. et al., 2013); il CYP, in particolare la famiglia CYP1, e alcuni metaboliti estrogeno-derivati, potrebbero assumere un ruolo importante. L'idrossilazione in posizione 2 e 4 del 17β -estradiolo ed dell'estrone, principalmente catalizzati dal CYP1A1, CYP1A2, and CYP3A4, possono generare ROS nel ciclo ossido-riduttivo tra le corrispondenti forme semichinoniche e chinoniche (Hayes CL et al., 1996; Tsuchiya Y et al., 2005). E' interessante notare come il nostro studio abbia evidenziato una marcata induzione a carico delle isoforme 1A1 e 1A2, nel rene, e

che, studi precedenti hanno riportato una correlazione tra l'aumento dell'attività di 17 β -estradiolo 4-idrossilasi, e l'aumento del danno al DNA in rene di cavia (Hayes C.L. et al., 1996).

Queste considerazioni trovano riscontro nei risultati di Rodriguez e Potter, che mettono in luce una associazione tra la sovra espressione dell'isoforma CYP1A1 e la progressione del tumore alla mammella, suggerendo di considerare il silenziamento del CYP1A1 come possibile strategia terapeutica (Rodriguez M. et al., 2013).

Discutendo del possibile ruolo co-cancerogeno che il CYP può ricoprire in determinate circostanze, è opportuno considerare che da un punto di vista molecolare, il meccanismo d'induzione dell'apparato CYP, avviene principalmente attraverso il coinvolgimento di recettori nucleari quali il recettore costitutivo per l'androstano (CAR), il recettore X per il pregnano (PXR), i recettori della proliferazione perossisomiale (PPAR) e il recettore arilico (AhR). La risposta pleiotropica all'attivazione di tali complessi, non si limita ad influenzare il metabolismo degli xenobiotici ma coinvolgerà numerosi altri processi inclusi quelli dalla proliferazione cellulare (Huang W. et al., 2005).

Per tali ragioni, l'induzione a carico dell'apparato CYP non può essere ristretto al solo campo del metabolismo, bensì, può essere considerato come un marcatore di rischio tumorale. A tale proposito, è stato dimostrato in modelli *in vivo*, come l'aumento dell'attività catalitica associata al CYP, provocata da induttori non-genotossici, determini un aumento dell'incidenza di tumori in diversi tessuti (Graham M.J. et al., 2008).

Nel rene, la somministrazione di VE ha portato ad una generale inattivazione degli enzimi post-ossidativi GST e UDPGT, indagati nel presente studio, insieme ad una riduzione della potenzialità antiossidante enzimatica.

Gli enzimi di fase II, detti anche detossificanti, esplicano la loro funzione principale coniugando con substrati endogeni i metaboliti generati (bioattivati) dagli enzimi di fase-I, facilitandone l'eliminazione. Per tale ragione, i sostenitori della teoria chemiopreventiva classica hanno sempre attribuito un potenziale ruolo benefico alle classi di composti che determinano un'up-regulation di questi enzimi (Jana S. et al., 2009). Al contrario, una loro inattivazione, come quella osservata nel presente studio, è stata sempre associata a una condizione di rischio.

I dati epidemiologici confermano un'aumentata incidenza di tumori nei pazienti con deficienze degli enzimi di fase II, così come, è nota da tempo, la correlazione tra pazienti con genotipo nullo per la GST M1 e rischio di tumori polmonari (Wilkinson J. et al., 1997).

Tuttavia, anche se ulteriori studi sono necessari per comprendere al meglio i meccanismi che ne stanno alla base, la letteratura scientifica recente, ha messo in luce come l'induzione della GST possa essere implicata nella resistenza ai chemioterapici, ed è stata proposta come possibile bersaglio allo scopo di poter migliorare la risposta ad alcuni farmaci antitumorali (Sau A. et al., 2010; Luo W. et al., 2011).

Anche gli induttori del CYP secondo alcuni autori, sarebbero in grado di diminuire la potenzialità cancerogena *in vivo* di alcune molecole. Alcuni studi sperimentali riporterebbero, infatti, come nell'induzione del CYP, l'aspetto legato alla rapida metabolizzazione quindi eliminazione, prevalga in termini di rischio/beneficio su quello associato alla produzione di potenziali cancerogeni (Conney A.H. et al., 2003). Altre teorie affermano che ciascun enzima del *drug-metabolism*, sia esso di

fase I o II, è caratterizzato da un doppio ruolo bioattivante/detossificante che non dipende dalla natura dell'enzima in sé, bensì, da quella della specie chimica con cui l'enzima reagisce (Paolini et al., 1998). Questo implica che la loro "preventiva" modulazione sia associata ad un'alterazione sia della detossificazione che della bioattivazione di molecole potenzialmente dannose (Paolini, 1998).

A prescindere dalle varie speculazioni che l'argomento nella sua complessità richiederebbe, ciò che appare chiaro, è il rischio associato ad una modulazione di questi enzimi intimamente connessi con meccanismi cellulari che possono contribuire alla cancerogenesi.

Osservando i dati sperimentali nel loro insieme, si nota come frequentemente, gli effetti riportati non rispettino un andamento dose/tempo dipendente. Diversi test riportano effetti più marcati a seguito del trattamento con la dose minima rispetto alla massima, così come, a parità di dose, il trattamento a quattordici giorni mostra modulazioni più tiepide rispetto ai sette giorni. 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.J. et al., 2001). 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.J. et al., 2003) e si possono verificare nel passaggio da un dosaggio inferiore ad uno superiore (Russo G.L. et al., 2007). Ne è un esempio, il comportamento dei raggi- γ , che determinano lo sviluppo di lesioni tumorali in modello murino seguendo un andamento ormetico, così come il resveratrolo che manifesta i propri effetti chemiopreventivi ad alti o bassi dosaggi (Russo G.L. et al., 2007).

I risultati ottenuti in rene e in prostata hanno portato a considerare l'ipotesi che in tali tessuti si potesse verificare un aumento di ROS con conseguente stress ossidativo. Nel caso del rene, in particolare, l'inattivazione degli enzimi di fase II e antiossidanti, accoppiata all'incremento dell'attività enzimatica del CYP, ha fatto pensare ad una alterazione dell'equilibrio "red-ox". Nonostante le sue indiscutibili proprietà antiossidanti, la VE avrebbe potuto agire paradossalmente come pro-ossidante.

Allo scopo di verificare tale ipotesi è stato studiato lo OSS nel tessuto renale e prostatico e i valori di ciascun gruppo sperimentale trattato con VE è stato comparato con i valori riscontrati nel gruppo di controllo.

Lo studio ha confermato quanto sopra ipotizzato, i risultati ottenuti con la spettroscopia di risonanza di spin elettronico (EPR), mostrano come il trattamento con VE sia associato ad un netto aumento dello OSS nel rene e nella prostata, che come precedentemente discusso, sono stati interessati da una generale induzione del CYP.

Il ruolo centrale dei ROS nel processo di cancerogenesi è testimoniato dall'abbondante presenza di alterazioni ossidative (genotossiche ed epigenetiche) nei tessuti tumorali (Loft S. et al., 1996), lo stress ossidativo sembra essere coinvolto in ciascuna fase del complesso processo che porta alla patologia conclamata (Cerutti P.A. et al., 1985; Klaunig J.E. et al., 2004). Elevati livelli di 8-Oxo-7,8-dihydroguanina, il prodotto di ossidazione della guanina, sono generalmente più elevati nei tessuti neoplastici, rappresentando un marcatore di instabilità genetica, a sostegno del ruolo primario che lo stress ossidativo ha nei confronti delle patologia tumorale. (Valavanidis A. et al., 2009). Lo stress ossidativo assumerebbe un ruolo

ancora più predominante nel caso di tumori che presentano una deplezione delle difese antiossidanti, o una riduzione dell'efficienza degli enzimi di riparo del DNA (Loft S. et al., 2008). Tuttavia, alcuni studi, nonostante confermino il ruolo dei ROS nell'incidenza del cancro, sostengono come il solo danno ossidativo al DNA non sia sufficiente ad innescare la patologia neoplastica. Ne sono prova i dati che riportano come la presenza di numerose patologie caratterizzate da una forte componente di stress ossidativo, non siano sempre in co-morbilità con l'insorgenza di cancro (Cooke M.S. et al., 2006). Come è stato discusso per il CYP, anche per lo stress ossidativo ci sono evidenze che mostrano come, l'incremento dei ROS si accompagni con una generale attivazione dei fattori di trascrizione e la conseguente espressione di geni che possono avere un ruolo attivo nella cancerogenesi, esercitando inoltre una pressione selettiva nei confronti di fenotipi maligni (Toyokuni S. et al., 1995).

E' necessario tuttavia precisare che se da un lato esiste un largo consenso nella letteratura scientifica nel considerare decisivo il contributo di livelli medio-bassi di ROS alle fasi d'iniziazione, promozione e progressione tumorale, alti livelli stress ossidativo, hanno mostrato indurre apoptosi e necrosi (Valko M. et al., 2004), ritardando, e in certi casi bloccando il processo patogenetico.

I risultati emersi dalla ricerca sono in accordo con recenti studi che attribuiscono alla VE un potenziale ruolo co-cancerogeno. L'applicazione a livello topico di VE in ratti con lesioni da raggi UVB, promuove la crescita tumorale (Burns E.M. et al., 2013). Sayin V.I. e collaboratori in uno studio *in vivo* mostrano come la somministrazione di due antiossidanti, *N*-acetilcisteina (NAC) e VE, acceleri la progressione tumorale. I risultati sono stati confermati in un modello *in vitro* che ha riportato come l'esposizione con VE aumenti la proliferazioni di cellule tumorali del polmone

(Sayin V.I. et al., 2014). La VE sembrerebbe esplicitare questo effetto attraverso la riduzione dell'espressione di p53, e al contempo limitando il danno al DNA da ROS. Evidenze più recenti sembrano confermare i risultati ottenuti, riportando come la somministrazione di VE e NAC incrementino significativamente l'invasività e la potenzialità di metastatizzazione di cellule di melanoma (Le Gal K. Et al., 2015). Nonostante le chiare limitazioni che si devono applicare all'estrapolazione dei risultati ottenuti nel modello animale, e qui discussi, i dati emersi sembrerebbero confermare il ruolo pro-cancerogeno della VE riportato da Wu e collaboratori (Wu Q.J. et al., 2015), che dimostrano, in uno studio di intervento con follow-up di oltre 12 anni, una associazione inversa tra il consumo di VE come integratore alimentare e il rischio di cancro. Conclusioni simili, non dovrebbero sorprendere, se si guarda ai risultati del ben noto trial ATBC (*Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study*), dal quale emerge come il β -carotene fosse positivamente correlato con l'aumento dell'incidenza di cancro al polmone in pazienti fumatori o esposti a fattori di rischio ambientale (ATBC study group, 1994).

Negli anni a seguire, fu dimostrato in un modello animale come la somministrazione di β -carotene, provochi a livello polmonare una marcata induzione di alcune isoforme del CYP, come CYP1A1, CYP1A2 e CYP2B1 che sono coinvolti nella bioattivazione delle ammine aromatiche, dei policiclici aromatici, aflatossine e diossine. Lo studio dello stress ossidativo nel tessuto, rilevò un'elevata presenza di ROS negli animali che ricevettero β -carotene rispetto al controllo (Paolini et al., 1999). Anche in quel caso, l'induzione dell'attività degli enzimi fase-I, unita alla sovra-produzione di ROS e altre specie radicaliche, fu proposta come possibile meccanismo co-cancerogenico in grado di contribuire a spiegare i risultati ottenuti sull'uomo.

Lo studio *in vitro* del progetto di ricerca ha avuto lo scopo principale di confermare in cellule di prostata umana (RWPE-1) gli effetti osservati nel modello animale.

Il nostro studio ha evidenziato un aumentomarcato dell'espressione genica, in termini di mRNA, associata ad alcune isoforme del CYP. Anche in questo caso, l'analisi EPR dell'OSS ha confermato un aumento anomalo di radicali liberi nelle cellule esposte alla VE rispetto al controllo.

Si è infine ipotizzato che l'aumento di stress ossidativo potesse essere accompagnato da uno stato infiammatorio. E' noto come i ROS possano innescare il rilascio di mediatori dell'infiammazione come citochine, chemochine e metaboliti dell'acido arachidonico che a loro volta producono specie reattive, in una sorta di circolo vizioso (Federico A. et al., 2007). Negli ultimi anni, il ruolo dell'infiammazione nell'insorgenza del cancro è stato studiato con particolare interesse (Hanahan D. et al., 2011). In alcuni tipi di tumore, l'infiammazione influenza il grado di malignità, così come, alcune condizioni infiammatorie croniche come la colite ulcerativa costituiscono fattori di rischio predisponenti al cancro del colon (Gupta R.B. et al., 2007). La ciclossigenasi 2 (COX-2) è uno dei mediatori dell'infiammazione che sembra giocare un ruolo chiave nella cancerogenesi. Recenti studi dimostrano come la COX-2 sia deregolata in diversi tumori (Janakiram N.B. et al., 2014), e che l'aumento della sua espressione costituisce un fattore di prognosi negativa per la sopravvivenza del paziente (Sicking I. et al., 2014). Elevati livelli di COX-2 portano ad un accumulo di uno dei suoi principali metaboliti la prostaglandina E₂ (PGE₂) prodotta a partire dall'acido arachidonico (Tai H.H. et al., 2002). Un aumento dei livelli di PGE₂ è stata osservata in lesioni cancerogene o pre-cancerogene e sembra essere responsabile di numerosi degli effetti pro-cancerogeni che l'induzione della

COX-2 comporta (Wu W.K. et al., 2010). Più recentemente è stato stabilito come la PGE₂, influenzi l'espressione di c-Myc, che a sua volta porta ad una perturbazione della sintesi di miRNA; ne risulta una riduzione della sintesi dell'oncosoppressore PTEN con conseguente resistenza all'apoptosi e aumento della proliferazione cellulare (Krishan K. et al., 2015).

Lo studio condotto con la presente tesi ha confermato l'ipotesi mostrando un netto incremento della COX-2 e della PGE₂ nelle cellule esposte alla VE.

Anche se per chiarire il meccanismo molecolare che porta agli effetti osservati della VE sono necessari ulteriori studi, i risultati ottenuti relativi all'incremento della bio-attivazione di pre-cancerogeni ubiquitari e alla over-generation di radicali liberi (co-cancerogenesi) analizzati nel loro complesso, potrebbero contribuire a spiegare l'aumentata incidenza di cancro alla prostata associata all'assunzione di VE emersa nel trial SELECT (Klein E.A. et al., 2011).

6. Conclusioni

Con il termine “paradosso degli antiossidanti” si fa riferimento ai numerosi casi in cui l’integrazione con dosi importanti di antiossidanti, risulta essere priva di effetti preventivi o terapeutici (Halliwell B. et al., 2000; Gutteridge J.M. et al., 2010). A dispetto di ciò, il mercato delle vitamine in forma d’integratori alimentari è in continua ascesa, e la VE è ad oggi uno dei prodotti più richiesti (Bailey R.L. et al., 2013).

La questione forse più rilevante, è che molte delle persone che fanno uso regolare di VE, non lo fanno allo scopo di compensare una carenza accertata, piuttosto, sembra che la gran parte dei consumatori abbia come scopo quello di migliorare il proprio stato di salute, prevenendo, o ritardando l’insorgenza di alcune patologie (Bailey R.L. et al., 2013; Wenner-Moyer, 2014).

Lo studio, nel suo complesso, evidenziando come la VE aumenti la bioattivazione di xenobiotici da una parte e si comporti da pro-ossidante dall’altra, ha portato alla luce quello che potrebbe essere “un lato oscuro” della VE, per molti aspetti simile a quello che anni fa fu osservato per il β -carotene, e, più in generale, impone una riflessione sul concetto, ancora oggi ben radicato, che “antioxidants are good, more antioxidants are better” (Halliwell B., 2013).

In un recente editoriale apparso sulla prestigiosa rivista *Nature*, è stato discusso il rapporto rischio/beneficio di una assunzione regolare di integratori vitaminici, cercando di dare una risposta alla domanda “l’integratori alimentari sono utili al mantenimento dello stato di salute?” La moderna letteratura scientifica, e lo studio presentato in questa tesi, sembrano offrire una sola, inequivocabile “mezza risposta”: “probabilmente sì per alcuni individui, a determinate dosi, probabilmente no per altri” (Wenner-Moyer, 2014).

7. Bibliografia

- Aitio A. *Anal Biochem*, 1978; 85: 488-491.
- ATBC study group *N. Engl. J. Med.* 1994; 330: 1029–1035.
- Bailey Y.L. Elsevier, Amsterdam, 1967.
- Baley R.L. et al., *JAMA Intern Med.* 2013; 173: 355-361.
- Bast A. et al., *Trends Pharmacol. Sci.* 1986; 7:226–227.
- Bauer C. et al., *Teratog Carcinog Mutagen.* 1995; 14: 13-22.
- Box P. et al., Wiley, New York, 1978.
- Bradbury K.E. et al., *Am J Clin Nutr.* 2014; Suppl 1: 394S-8S.
- Briehl M.M. et al., *Redox Biology.* 2015; 11: 124–139.
- Brigelius-Flohé R. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 305: 737-740.
- Bruce M. *Meth Enzymol.* 1967; 10: 551-557.
- Bruno R.D. et al., *Bioorg Med Chem.* 2007; 15: 5047–5060.
- Burke M.D. et al., *Biochem Pharmacol.* 1985; 34: 3337-3345.
- Burns E.M. et al., *PLoS One.* 2013; 8: e63809.
- Burton G.W. et al., *Acc Chem Res* 1986; 19: 194-201.
- Calabrese E.J. et al., *Toxicol Sci* 2003; 71: 246-250.
- Calabrese E.J. et al., *Trends Pharmacol Sci.* 2001; 22: 285- 291.
- Campbell S. et al., *Crit Rev Oncol Hematol* 2003; 47: 249-259.
- Cantelli-Forti G. et al., *Mutat Res.* 1998; 402: 179-183.
- Carpenter M.P. et al., *Ann N Y Acad Sci* 1972; 203: 81-82.
- Carratù B. et al., *Ann Ist Super Sanita.* 2005; 41: 7-16.
- Cerutti P.A. et al., *Science.* 1985; 227: 375–381.
- Clark L.C. et al., *JAMA.* 1996; 276: 1957-1963.

Cohen C. et al., *Nutrients*. 2014; 6: 3214-3229.

Conney AH. *Cancer Res*. 2003; 63: 7005-7031.

Cooke M.S. et al., *Clin Chim Acta*. 2006; 365: 30–49

Das B.N. et al., *Oxid Med Cell Longev*. 2013; 2013: 7. 839409.

Dickins M. *Curr. Top. Med. Chem*. 2004; 4: 1745–1766.

Elsherbiny M.E. et al., *Drug Metab Rev*. 2011; 43: 457-475.

Ernster L. *Methods Enzymol*. 1967; 10: 309-317.

Federico A. et al., *Int J Cancer*. 2007; 121: 2381-2386.

Foerster S.B. et al., *Am J Prev Med*. 1995; 11: 124-31.

Gatenby R.A. et al., *Nature Reviews Cancer*. 2004; 4: 891–899.

Gaziano J.M. et al., *JAMA*. 2008; 301: 52–62. 38.

Glatt H. et al., *2001 Mutat Res*. 2001; 482: 27-40.

Go R.E. et al., *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2015; 147: 24-30.

Graham M.J. et al., *Toxicology*. 2008; 254; 184-191.

Grebenstein N. et al., *Mol Nutr Food Res*. 2014; 58: 1052–1060.

Guengerich F.P. *AAPS J*. 2006; 8: E101-111.

Guengerich F.P. et al., *Crit Rev Toxicol*. 1985; 14: 259-307.

Guengerich F.P. et al., *Carcinogenesis*. 1990; 11: 2275–2279.

Gupta R.B. et al., *Gastroenterology*. 2007; 133: 1099–1105.

Gutteridge J.M. et al., *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 393: 561-564.

Habig W.H. et al., *J Biol Chem*. 1974; 249: 7130-7139.

Halliwell B. et al., *Lancet*. 2000; 355: 1179-1180.

Halliwell B. *Free Radic Res*. 1999; 31: 261-272.

Halliwell B., *Br J Clin Pharmacol*. 2013; 75: 637-44.

Hanahan D. et al., *Cell*. 2011; 144: 646–674.

Hayes C.L. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93(18): 9776-81.

Heimendinger J. et al., *Adv Exp Med Biol.* 1996; 401: 199-206.

Heinonen O.P. et al., *J. Natl. Cancer Inst.* 1998; 90: 440–446.

Herr I. et al., *Cancer Treat Rev.* 2010; 36: 377-383.

Hirose M. et al., *International Journal of Cancer.* 1998; 77: 773–777.

Hodges N.J et al., *Mutagenesis.* 2007; 27: 189-94.

Holsapple M.P. et al., *Toxicol. Sci.* 2006; 89: 51–56.

Hosomi A. et al., *FEBS Lett.* 1997; 409: 105–108.

Huang H.Y. *Sci Signal.* 2013; 6-19.

Huang S. et al., *Oncogene.* 2001; 20: 4188–4197.

Huang W. et al., *Mol. Endocrinol.* 2005; 19: 1646–1653.

Hybertson B.M. et al., *Mol Aspects Med.* 2011; 32: 234–246.

Jana S. et al., *Curr Drug Metab.* 2009; 10: 595-616.

Janakiram N.B et al., *Adv Exp Med Biol.* 2014; 816: 25–52.

Jancova P. et al., *Biomed Pop Med Fac Univ Palacky Olomouc Repub.* 2010; 154; 103-116.

Johnson C.H. et al., *Drug Met Dispos.* 2013; 41: 406-413.

Ju J. et al., *Carcinogenesis* 2010; 31: 533-542.

Karin M. et al., *Annu Rev Immunol.* 2000; 18: 621–663.

Klaunig J.E. et al., *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2004; 44: 239-67.

Klein E.A. et al., *JAMA.* 2011; 306(14):1549-1556.

Kleith B. et al., *Cell.* 2007; 129: 465–472.

Kluth D. et al., 2005; *Free Radic Biol Med.* 15; 38: 507-514.

Kohar I. et al., *Free Radic Biol Med.* 1995; 19: 197-207.

Kondoh M. et al., *PLoS ONE*; 8: e80349.

Krishan K. et al., *Mol Cancer Res.* 2014; 12: 765–774.

Kristin R. et al., *Cancer Growth and Metastasis.* 2014; 7: 19-25.

Landi L. et al., 1997 *Free Radic Biol Med.* 1997; 22: 329-335.

Lee H.R. et al., *Toxicology*. 2013; F304:13-20.

León-Buitimea A. et al., *Toxicol Lett*. 2012; 209: 161-165.

Lewis D.F. *Pharmacogenomics*. 2003; 4: 387-395.

Lin J. et al., *J. Natl. Cancer Inst*. 2009; 101: 14–23.

Lin J.H. et al., *Clin Pharmacokynet*. 1998; 35; 361-390.

Lippman S.M. et al., *JAMA*. 2009; 301: 39–51.

Loft S. et al., *Eur J Nutr*. 2008; 47 Suppl 2: 19-28.

Lowry H.J. et al., *Biol Chem*. 1951; 193: 265–275.

Lubet R.A. et al., *Arch Biochem Biophys*. 1985; 238: 43-48.

Luo W. et al., *Front Oncol*. 2011; 1: 39.

Mackenzie P.I. et al., *Anal Biochem*. 1980; 109: 362-368.

Maiese K. et al., *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2015; 87596: 17.

Maugeri-Saccà M. et al., *Clinical Cancer Research*. 2011; 17: 4942–4947.

Mazel P. The Williams & Wilkins Company, Baltimore MD, 1971, 546-555.

McIlwain C.C. et al., *Oncogene*. 2006; 25: 1639-1648.

Miller E.R. 3rd et al., *Ann Intern Med*. 2005; 142: 37-46.

Mizzuno N. et al., *Pharmacol Rev*. 2003; 55: 425-461.

Morse M.A. et al., *Carcinogenesis*. 1993; 14: 1737-1746.

Murray M, *Biochem Pharmacol*. 1991; 42: 1-7

Mustachic D.J. et al., *J Nutr Biochem*. 2009; 20: 469-476.

Mustacich D.J. te al., *Free Radic Biol Med*. 2006; 41: 1069-1078.

Nash T. *Biochem J*. 1953; 55: 416–421.

Nebert D.W. et al., *Prog Liver Dis*. 1994; 12: 63-97.

Nebert D.W. *Hepatology*. 1991; 14; 398-401.

Okoh V.O. et al., *British Journal of Cancer*. 2015; 112: 1687–1702.

Omenn G.S. et al., *N. Engl. J. Med*. 1996; 334: 1150–1155.

Omura T. et al., *Biol. Chem.*, 1964; 239: 2370-2385.

Orellana M, Guajardo V. *Rev Med Chile* 2004; 132: 85-94.

Orenstein L. et al., *Nutr Cancer*. 2016; 23: 1-10.

Paolini et al., *Nature*. 1999; 398: 760-761.

Paolini M. et al., *Free Radic Res*. 2003; 37: 503-508.

Paolini M. et al., *J Investig Med*. 1996; 44: 470-473.

Paolini M. *Tox Appl Pharmacol*. 1998; 152: 293-294.

Peters U. et al., *Cancer Causes Control* 2008; 19: 75-87.

Potter J.D. *Carcinogenesis*. **2014**; 35: 974-982.

Potter J.D. et al., *Oncology*. 1996; 10: 1487–1488.

Psaty B.M. et al., *J. Med.*, 2006; 355: 950–952.

Psaty B.M. et al., *N. Engl. J. Med*. 2006; 355: 950–952.

Puntarulo S. et al., *Free Radic Biol Med*. 1998; 24: 324-1330.

Reinke L.A. et al., *Drugs Metab Disp*. 1985; 13: 548-52.

Reuland D.J. et al., *Free Radic Biol Med*. 2013; 56: 102–111.

Reuter S. et al., *Free Radical Biology and Medicine*. 2010; 49:1603–1616.

Reynolds T. *J Natl Cancer Inst*. 1991; 83: 1538-1539.

Rodriguez M. et al., *Mol Cancer Res*. 2013; 11(7): 780-92.

Rodriguez-Antona C. et al., *Hum Genet*. 2010; 127: 1–17.

Rowe L. et al., *Biochem Pharmacol*. 1976; 25: 175-179.

Russo G.L. et al., *Biochem Pharmacol* 2007; 74: 533-544.

Sapone A. et al., *J Biomed Biotechnol*. 2012; 2012: 790987.

Sau A. et al., *Arch Biochem Biophys*. 2010; 500(2): 116-22.

Schimida T. et al., *Cancer Sci*. 2004; 95(1):1-6.

Schmölz L. et al., *World J Biol Chem*. 2016; 7: 14-43.

Scott E.E. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100: 13196-13201.

Sergentanis T.N. et al., *Breast Cancer Res Treat.* 2010; 121: 195-202.

Sesso H.D. et al., *JAMA.* 2008; 300: 2123-2133.

Shankar S. et al., *Pharmacol Ther.* 2013; 138: 1–17.

Sheehan D. et al., *Biochem J.* 2001; 360: 1-16.

Shu L. et al., *Cancer Metastasis Rev.* 2010; 29: 483–502.

Sicking I. et al., *BMC Cancer.* 2014; 14: 952.

Sidorova Y.A. et al., *Bull Exp Biol Med.* 2003; 136: 38-41.

Slemenova D. et al., *Neoplasma.* 2013; 60: 343–354.

Sontag T.J. et al., *J Biol Chem.* 2002; 277: 25290–25296.

Sporn M.B. et al., *Nev Rev Cancer.* 2002; 2: 537-543.

Steinkellner H. et al., *Adv Exp Med Biol.* 2001; 500: 629-633.

Steward W.P. et al., *Br J Cancer.* 2013; 109: 1–7.

Strott C.A. et al., *Endocr Rev.* 2002; 23: 703-732.

Tafani M. et al., *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2016; 3907147: 18.

Tai H.H. et al., *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002; 68-69: 483–493.

Tochhawng L. et al., *Mitochondrion.* 2013; 13: 246–253.

Toyokuni S, et al., *EBS Lett.* 1995; 358: 1–3.

Traber M.G. *Mol Nutr Food Res.* 2010; 54: 661-668.

Tsao A.S. et al., *Cancer J Clin.* 2004; 54: 150-180.

Tsuchiya Y. et al., *Cancer Lett.* 2005; 227: 115-24.

Upham B.L. et al., *Carcinogenesis.* 1997; 18: 37-42.

Valavandis A. et al., *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2009; 27(2): 120-39.

Valgimigli L. et al., *Free Radic Biol Med.* 2001; 31: 708-716.

Valgimigli L. et al., *Free Radic Res.* 2000; 33: 167-78.

Valgimigli M. et al., *Free Radic Res.*, 2002; 36: 939-948.

Valko M. et al., *Chem Biol Interact.* 2006 10;160:1-40.

Valko M. et al., *Mol Cell Biochem.* 2004; 266: 37-56.

Van Antwerp D.J. et al., *Science.* 1996; 274: 787–789.

Vineis P et al., *Carcinogenesis.* 2010; 31, 1703–1709.

Vineis P. et al., *Carcinogenesis.* 2010; 31: 1703-1709.

Wang X. et al., *BMJ.* 2014; 349:g4490.

Weinstein S.J. et al., *Plos One* 2012; 7: e40204.

Weng C.J. et al., *Cancer Treat Rev.* 2012; 38: 76–87.

Wheeler C.R. et al., *Anal Biochem.* 1990; 184: 193-199.

Wilkinson J^{4th}. et al., *Proc Soc Exp Biol Med.* 1997; 216(2): 192-200.

Wnner-Moyer M., *Nature.* 2014; 510: 462-464.

Wolfe K.J. et al., *Pharmacogenet Genomics.* 2007; 17: 897-905.

Wu Q.J. et al., *Int J Cancer.* 2015; 136: 610-7.

Wu Q.J. *Int J Cancer.* 2015; 136: 610-7.

Wu W.K. et al., *Cancer Lett.* 2010; 295: 7–16.

Xu L. et al., *Chem. Biol. Interact.* 2000; 124: 173–189.

Yang C.S. et al., *Cancer Research.* 1996; 37: 665–666.

Yang C.S. et al., *Mol Nutr Food Res.* 2016 Feb 10. doi: 10.1002/mnfr.201500766.
[Epub ahead of print]

Yoshinari K. et al., *RSC Publishing, Cambridge.* 2008; 417–448.

Zanger U.M. et al., *Pharmacol Ther.* 2013; 138.

