

## INDICE

1. INTRODUZIONE .....	5
1.1. Dieta mediterranea, olio di oliva e polifenoli.....	7
1.2. Cancerogenesi.....	11
1.3. Effetti chemio preventivi dei polifenoli dell'olio di oliva.....	20
1.3.1. Effetti dei polifenoli sulla prevenzione del danno ossidativo al DNA e sulla fase di iniziazione.....	20
1.3.2. Effetti dei polifenoli sulla fase di promozione/progressione del processo di cancerogenesi .....	21
1.3.2.1. Idrossitirosolo.....	22
1.3.2.2. Derivati organosolforici di sintesi dell'idrossitirosolo.....	27
1.3.2.3. Lignani .....	28
1.4. Chemioresistenza.....	32
2. MATERIALI E METODI .....	36
2.1 Materiali.....	36
2.2. Trattamenti cellulari .....	38
2.3. Valutazione della proliferazione.....	39
2.3.1 Metodo del Trypan Blue.....	39

2.3.2 Test colorimetrico dell'MTT (bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) .....	39
2.4 Valutazione dell'apoptosi .....	40
2.4.1. Microscopia a fluorescenza .....	40
2.4.2 Analisi del picco Sub G1.....	41
2.4.3 Saggio dell'Annessina V .....	42
2.5 Dosaggio della concentrazione di H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> nei terreni di coltura .....	42
2.6 Analisi del ciclo cellulare.....	43
2.7 Determinazione del differenziamento.....	43
2.7.1. Test della riduzione dei sali di nitro blu di tetrazolio (NBT-TEST) per il differenziamento delle HL60.....	43
2.7.1.1 Dosaggio spettrofotometrico .....	44
2.7.1.2 Analisi al microscopio ottico .....	44
2.7.2. Test della Di-Cloro-Fluoresceina Di-Acetato (DCF-DA).....	45
2.7.3. Test dei Superossidi .....	45
2.7.4. Valutazione dell' espressione dell' antigene di superficie CD11b .....	46
2.7.5. Valutazione del differenziamento delle cellule di eritroleucemia K562 mediante il Test della Benzydina.....	47

2.8. Western Blotting .....	48
2.8.1. Estrazione delle proteine .....	48
2.8.2. Elettroforesi .....	48
2.9 Valutazione del trascritto genico mediante RT-PCR .....	49
2.10. Analisi dei dati .....	51
Composti fenolici .....	52
3. RISULTATI .....	53
3.1. Effetti degli estratti fenolici sulla proliferazione e sul ciclo cellulare delle HL60 .....	53
3.2. Effetto del trattamento con gli estratti sull'apoptosi delle cellule HL60 .....	59
3.3 Analisi della correlazione tra la composizione fenolica e gli effetti chemio preventivi degli estratti.....	62
<b>Apoptosi, %</b> .....	63
3.4. Produzione di H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> da parte dell'Idrossitirosolo e induzione dell'apoptosi .....	64
3.5. Effetti dei differenti terreni sulla produzione di H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> mediata dall'idrossitirosolo e apoptosi.....	68
3.6. Meccanismi attraverso il quale l'idrossitirosolo induce la formazione di H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	72
3.7. Effetto antiproliferativo, proapoptotico e differenziante del pinosresinolo .....	73
3.7.1. Effetto antiproliferativo sulle cellule HL60 .....	73

3.7.2. Effetti del pinoresinolo sull'apoptosi e sul ciclo cellulare.....	76
3.7.3. Analisi del differenziamento mediante il test dell'NBT.....	80
3.7.4. Test della DCF-DA (DiCloroFluoresceina DiAcetato) e dei superossidi .....	84
3.7.5. Espressione dell' antigene di superficie CD11b.....	85
3.7.6. Effetto antiproliferativo, proapoptotico e differenziante del pinoresinolo sulle cellule K562 .....	87
3.7.7. Valutazione dell'espressione della p21.....	88
3.8. Effetti antiproliferativi e proapoptotici dei derivati di sintesi dell'idrossitirosolo sulle HL60, sulle HL60R e sulle cellule HCT116 ed SW480 .....	89
4. DISCUSSIONE.....	94
4.1. Effetti chemio preventivi degli Estratti Fenolici.....	94
4.2. Effetti chemio preventivi dell'Idrossitirosolo .....	96
4.3. Effetti chemio preventivi del pinoresinolo.....	98
4.4. Effetti chemio preventivi dei derivati di sintesi dell'idrossitirosolo: disulfide, tioacetato e tiolo .....	101
5. CONCLUSIONI .....	103
5.1 BIBLIOGRAFIA.....	108

## **1. INTRODUZIONE**

Le neoplasie rappresentano una delle malattie con più elevato indice di mortalità nei Paesi industrializzati: un individuo su tre contrae infatti una neoplasia nel corso della sua vita e un individuo su quattro decede a causa di essa (1). Secondo i dati forniti dal CENSIS per il 2010, il numero di persone alle quali nel corso della propria vita è stato diagnosticato il cancro ammonta a circa 1.9 milioni, mentre il numero di nuovi casi di tumore, sempre per il 2010 è stato pari a 235 mila (2). La terapia medica delle neoplasie è attualmente basata sull'uso di composti, sia naturali che di sintesi, i quali attraverso meccanismi sia citotossici che citostatici, arrestano lo sviluppo del tumore o che, attraverso l'induzione del differenziamento, riescono a riportare le cellule al fenotipo normale (3). Questa strategia farmacologica, sebbene efficace in alcuni casi, provoca numerosi effetti tossici dovuti all'azione che questi farmaci hanno anche nei confronti delle cellule dei tessuti sani che possiedono una elevata frazione di cellule proliferanti, quali le cellule midollari, le cellule epiteliali e/o quelle dei bulbi piliferi, ecc. (3). Inoltre, solo nel caso di alcuni tumori del sangue, quali linfomi e leucemie, porta alla completa remissione della malattia, mentre nel caso dei tumori solidi, dopo un periodo più o meno lungo a seguito del trattamento, si ha in genere la ricomparsa della malattia dovuta alla selezione di cellule staminali tumorali resistenti al trattamento farmacologico che danno luogo a recidive (4). L'attività di ricerca in campo oncologico è quindi sempre più indirizzata verso la selezione di nuove molecole dotate di maggiore attività e di minore tossicità nei confronti dei tessuti sani. Inoltre, si fa sempre più strada la consapevolezza che la prevenzione, effettuata sia attraverso la riduzione dell'esposizione ai fattori di rischio che attraverso l'assunzione con l'alimentazione di composti che possono esercitare un'azione protettiva nei confronti delle neoplasie, può essere la via più efficace

per ridurre l'incidenza e quindi la mortalità. In questo contesto, il ruolo giocato dalla dieta mediterranea, come esempio di sano e corretto regime alimentare, è ben stabilito (5).

La dieta mediterranea, rimasta pressoché invariata nel corso di vari millenni presso i popoli che vivono nei Paesi del bacino del Mediterraneo, è stata portata all'attenzione della comunità scientifica da Ancel Keys nel 1979 come modello di dieta dalle proprietà benefiche per la salute umana (6). Durante un congresso tenutosi nell'isola di Creta negli anni '40, Keys notò che l'incidenza dell'infarto del miocardio presso gli abitanti dell'isola era molto bassa. Egli si rese inoltre conto che lo stile alimentare degli abitanti dell'isola, molto diverso da quello degli Stati Uniti in cui viveva, era un fattore molto importante nel determinare l'assenza di individui obesi. Vent'anni dopo la sua intuizione trovò il primo riscontro scientifico nel corso di uno studio epidemiologico durante il quale Keys et collegues dimostrarono che il regime alimentare tipico dei Paesi dell'area del Mediterraneo, caratterizzato dall'uso di olio d'oliva come principale fonte di grassi, da un elevato consumo di frutta, verdura, legumi, pesce e carboidrati complessi e da un consumo moderato di carne, era associato alla riduzione dell'incidenza delle malattie coronariche (6, 7). Sulla base di queste prime osservazioni, numerosi studi epidemiologici condotti negli anni successivi permisero di individuare l'esistenza di un'associazione inversa tra la maggiore aderenza della popolazione alla dieta mediterranea e la riduzione dell'incidenza delle principali malattie cronico-degenerative, quali ad esempio il cancro (8, 12, 13) e del rischio di mortalità (9 - 11). Sebbene i componenti responsabili di tali effetti comincino ad essere conosciuti, i meccanismi attraverso i quali questi alimenti esercitano un'attività preventiva, nonostante siano stati oggetto di numerosi e approfonditi studi, non sono ancora del tutto noti (14).

### ***1.1. Dieta mediterranea, olio di oliva e polifenoli.***

L'olio di oliva è la principale fonte di grassi in uso tra i popoli dei paesi del bacino del Mediterraneo. Dal punto di vista chimico l'olio di oliva è costituito da due frazioni: una cosiddetta saponificabile (90-99%) ed una non saponificabile (0,4-5%).

Della frazione saponificabile fanno parte acidi grassi saturi, mono e polinsaturi. L'elevato contenuto di acidi grassi monoinsaturi presenti nell'olio d'oliva è la principale caratteristica che lo differenzia dagli altri grassi di origine vegetale, in cui il rapporto tra acidi grassi saturi e insaturi è a favore dei primi. Gli acidi grassi saturi presenti in maggiore quantità sono il palmitico (9 - 15%) e lo stearico (0,5 - 4%). Tra gli acidi grassi insaturi, il più rappresentato è l'acido oleico (70 - 80% circa), un acido grasso monoinsaturo, seguito dall'acido linolenico (0,1 - 0,6%) e linoleico (6 - 15%), che sono invece acidi grassi polinsaturi, chiamati anche "acidi grassi essenziali" (AGE) poiché indispensabili per l'accrescimento e la funzionalità dei tessuti dell'uomo che non è in grado di sintetizzarli.

La frazione insaponificabile è costituita da un numeroso gruppo di componenti minori (circa 220 sostanze) che complessivamente costituiscono l'0,5 - 1,5% del totale e svolgono un ruolo molto importante, sia dal punto di vista nutrizionale e salutistico, che organolettico. Questi composti vengono in genere suddivisi in due categorie in funzione della loro idrofilia o lipofilia. Rientrano nella composizione della frazione lipofila: tocoferoli, carotenoidi e alcune sostanze di natura steroidea. Della frazione idrofila fanno invece parte flavonoidi e polifenoli. I polifenoli dell'olio extravergine di oliva vengono comunemente distinti in molecole semplici, come l'acido vanillico, cumarico, gallico, caffeico, il tirosolo e l'idrossitirosolo, e molecole complesse come i secoiridoidi (oleuropeina e ligstroside) e i lignani (1-acetossipinoresinolo e pinoresinolo) (15).

L'idrossitirosolo, il tirosolo e i loro derivati secoiridoidi, che includono anche l'oleuropeina, l'oleuropeina aglicone e il ligstroside aglicone, sono esclusivamente presenti nell'olio di oliva (16). La composizione quali-quantitativa dei polifenoli totali, indice della qualità di un olio, varia in relazione a diversi fattori, tra cui le differenti cultivar, il grado di maturazione delle olive e le tecnologie di estrazione dell'olio (17).

Numerosi studi epidemiologici evidenziano come gli effetti benefici della dieta mediterranea sulla salute dell'uomo e le sue proprietà preventive nei confronti di diverse patologie sembrano essere legati al consumo dell'olio extravergine di oliva. È stato infatti dimostrato che esiste una correlazione inversa tra il consumo di olio di oliva e la riduzione dell'incidenza di numerose malattie, in particolare di quelle a carico dell'apparato cardiovascolare in cui è coinvolto il processo di aterosclerosi (18) e dei tumori in corrispondenza di diversi siti, come ad esempio il seno (19 - 21), la prostata (22, 23), la cavità orale (24) e il colon (25).

I risultati emersi nel corso di questi studi epidemiologici sono stati supportati anche da sperimentazioni effettuate su diversi modelli animali, che hanno dimostrato la capacità dell'olio di oliva di esercitare un'azione protettiva nei confronti della cancerogenesi indotta chimicamente, ad esempio nel caso dei tumori al seno indotti dal dimetil benzossi antracene (DMBA) (26) e dei tumori al colon indotti dall'azossi metano (AZM) (27), di proteggere la pelle dai tumori indotti dai raggi UV (28) e di ridurre l'incidenza della comparsa spontanea di tumori al fegato nei ratti (29).

La scienza della nutrizione riconosce all'olio extravergine d'oliva la più equilibrata composizione in acidi grassi saturi, mono e polinsaturi, e la più idonea ai fini nutrizionali e dietetici (30). Gli effetti benefici dell'olio di oliva sulla salute umana sono stati inizialmente attribuiti all'elevato contenuto in acidi grassi

monoinsaturi (31), mentre minore attenzione è stata riservata alla frazione non saponificabile e, principalmente, ai polifenoli. I polifenoli naturali sono metaboliti secondari delle piante (32) che vengono generalmente suddivisi in diverse classi in relazione alla loro struttura chimica di base. Si riconoscono pertanto acidi, alcoli, flavonoidi, stilbeni e lignani (33 - 35). Gli effetti benefici di questi composti per la salute umana sono molto vari e dipendono principalmente dalla capacità che essi hanno di comportarsi come potenti antiossidanti e scavenger dei radicali liberi (35 - 41), prevenendo a diversi livelli il danno cellulare indotto dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS). È stato suggerito da alcuni Autori che, tra questi composti, solo quelli che hanno un struttura catecolica, caratterizzata da un anello aromatico a cui sono legati due gruppi idrossilici, siano importanti ai fini della salute umana. La presenza dell'anello catecolico conferisce infatti ai polifenoli una potente attività antiossidante in quanto questo gruppo è capace di stabilizzare la struttura dei radicali liberi attraverso la formazione di legami a idrogeno intramolecolari (42). Sembra inoltre che i composti dotati di maggiore attività antiossidante siano quelli in cui i due gruppi idrossilici si trovano in posizione orto, piuttosto che in posizione meta o para.

Numerose evidenze sperimentali hanno dimostrato che questi composti sono in grado di esercitare un ruolo protettivo nei confronti delle malattie neurodegenerative (42 - 44), delle malattie a carico del sistema cardiovascolare (45 - 47), delle sindromi metaboliche (48, 49), del diabete (50, 51) e di varie patologie correlate all'infiammazione (52, 53). Nel corso di studi condotti *in vitro* su campioni di plasma umano è inoltre emerso che queste molecole posseggono, a basse concentrazioni, un effetto inibitore su vari indici di ossidazione lipidica, proteggendo le LDL dall'ossidazione indotta dall'esposizione ai metalli di

transizione (54). Dati riportati da altri autori hanno inoltre dimostrato che queste molecole sono in grado di ridurre l'ossidazione dei fosfolipidi nei liposomi (55), il danno ossidativo, la produzione di radicali liberi e l'aggregazione piastrinica (56) e di inibire il danno al DNA causato dai perossinitriti (57). La formazione delle ROS avviene continuamente nell'organismo umano in seguito ai processi metabolici; in condizioni normali esiste un equilibrio tra sostanze ossidanti e antiossidanti. L'organismo umano è infatti in grado di contrastare l'azione dei radicali liberi neutralizzandoli o riparando a vari livelli il danno cellulare da essi prodotto, attraverso una serie di meccanismi protettivi sia di natura enzimatica (GSH perossidasi, GSH reduttasi, superossidodismutasi, catalasi, NADPH/NADP<sup>+</sup>, NADH/NAD<sup>+</sup>), che di natura non enzimatica (acido urico, acido ascorbico, vitamina A, vitamina E, Q10, β-carotene) (57). Un'alterazione di questa condizione di equilibrio porta all'accumulo di radicali liberi e quindi a stress ossidativo che, se persiste, determina l'insorgenza di patologie cronico - degenerative a carico di diversi apparati. Pertanto, gli studi nutrizionali sono sempre più focalizzati sugli effetti preventivi della supplementazione con nutrienti ad attività antiossidante. Evidenze dirette a sostegno di questa ipotesi provengono da uno studio di intervento condotto recentemente su donne in menopausa la cui alimentazione era stata integrata con olio di oliva contenente un' elevata quantità di composti fenolici e in cui è stata osservata una riduzione del danno ossidativo a carico del DNA dei linfociti (58).

Una dieta equilibrata dal punto di vista della composizione quali - quantitativa in acidi grassi e ricca in sostanze antiossidanti, oltre ad essere in grado di influenzare positivamente la suscettibilità dell'organismo ai processi ossidativi (59), gioca un ruolo importante anche nella prevenzione della cancerogenesi (60 - 62). In campo oncologico sempre maggiore attenzione è stata quindi riservata

allo studio delle proprietà chemiopreventive dei polifenoli dell'olio di oliva (63 - 69).

### ***1.2. Cancerogenesi***

La cancerogenesi è un processo che viene comunemente suddiviso in tre distinte fasi: iniziazione, promozione e progressione (70). L'iniziazione è un processo estremamente rapido e irreversibile, dovuto a modificazioni indotte direttamente al DNA cellulare da fattori che possono essere fisici, chimici o virali (71). Tra i fattori fisici vi sono le radiazioni ionizzanti, che possono agire sia aumentando la produzione di specie radicaliche dell'ossigeno, che danneggiando le basi azotate del DNA modificando i livelli di espressione dei geni oncosoppressori, degli oncogeni e dei geni per il complesso maggiore di istocompatibilità (72). I fattori chimici sono costituiti da agenti alchilanti, nitrosammine e grassi polinsaturi che agiscono danneggiando l'estremità ammino terminale dei residui di guanina (73). Infine, i cancerogeni di natura virale, come ad esempio il virus del papilloma umano (HPV) (73), il virus di Hepstein Bar (74), gli epatovirus B e C, agiscono introducendo il loro patrimonio genetico nella cellula ospite in prossimità dei protooncogeni e degli oncosoppressori, attivando la trascrizione dei primi e inibendo quella dei secondi (75 - 78). La promozione è invece un fenomeno lento, ripetitivo e reversibile che può essere influenzato o modulato da numerosi fattori ambientali. Questa fase è regolata dall'attivazione dei recettori per i fattori di crescita da parte dei ligandi specifici e porta alla formazione del tessuto neoplastico, con aumento dell'angiogenesi e degradazione della matrice extracellulare (79 - 81). I fattori di crescita possono essere sintetizzati sia dalla stessa cellula che da cellule vicine. Alcuni ormoni possono comportarsi da fattori di crescita legandosi sia a recettori posti sulla superficie extracellulare che

all'interno della cellula stessa (82 - 85). Infine, la progressione del tumore coincide con l'acquisizione da parte delle cellule tumorali della capacità di diffondere e di attaccarsi a tessuti lontani dalla sede di origine, con formazione di tumori secondari (metastasi).

Le mutazioni che portano alla trasformazione delle cellule normali in cellule maligne riguardano i geni che controllano la proliferazione e la morte cellulare (86). Come conseguenza dell'accumulo di queste mutazioni verrà aumentata la trascrizione degli oncogeni e ridotta quella degli oncosoppressori. L'overespressione, l'attivazione costitutiva e la modificazione degli oncogeni portano a una continua replicazione delle cellule trasformate in assenza di un segnale mitogeno e alla perdita della capacità di attivare l'apoptosi. Gli oncogeni codificano infatti per classi di proteine che esercitano un controllo positivo sulla proliferazione cellulare e negativo sull'apoptosi. Tra questi vi sono i fattori di crescita (ad esempio PDGF), i recettori per i fattori di crescita (ad esempio EGF), molecole citoplasmatiche coinvolte nelle cascate di trasduzione del segnale (proteine chinasi o proteine che attivano le proteine chinasi, come ad esempio Raf e Ras), proteine che controllano il processo apoptotico (Bcl-2), proteine nucleari che regolano il ciclo cellulare (cicline e CDK) e fattori di trascrizione (Myc) (86, 87). Le mutazioni degli oncosoppressori portano invece alla perdita o all'inattivazione di proteine che esercitano un controllo inibitorio sul ciclo cellulare e che promuovono l'apoptosi, quali ad esempio la proteina p53 e la proteina del retinoblastoma Rb (87).

Il ciclo cellulare può essere definito come la successione estremamente ordinata di eventi che permettono ad una cellula di duplicare tutte le sue componenti e di dare origine a due cellule figlie. Si compone di quattro distinte fasi: la fase G<sub>1</sub>, caratterizzata dall'aumento della sintesi di RNA e proteine; la fase S, durante la

quale si ha la duplicazione di tutto il DNA della cellula; la fase G<sub>2</sub>, in cui si completa la duplicazione del DNA e si sintetizzano proteine utili per la mitosi (ad es. la tubulina); la mitosi, o fase M, in cui si ha la divisione nucleare e citoplasmatica. La corretta progressione del ciclo cellulare attraverso le varie fasi è regolata dalla fosforilazione e defosforilazione dei complessi cicline/chinasi ciclina-dipendenti (CDK) da parte di specifiche chinasi (CAK) e fosfatasi (Cdc25), in corrispondenza di punti di restrizione, o check point, localizzati a livello delle transizioni G<sub>1</sub>/S e G<sub>2</sub>/M (88). I punti di restrizione o check point sono vere e proprie vie di trasduzione del segnale che monitorano il corretto completamento di una fase del ciclo cellulare prima di procedere alla fase successiva. A livello dei punti di restrizione sono infatti situate proteine che fungono da sensori e che passano in rassegna la cromatina alla ricerca di DNA parzialmente replicato, di rotture alla doppia elica del DNA o altre anomalie. Queste proteine hanno inoltre il compito di tradurre tali informazioni in segnali biochimici, modulando l'espressione di specifiche proteine target e attivando vie di segnalazione coinvolte nella riparazione del DNA e nell'arresto del ciclo cellulare (89). L'importanza di queste vie di segnalazione è supportata dal fatto che esse sono strutture altamente conservate e la loro alterazione è un evento chiave nella genesi dei tumori. I complessi cicline/CDK sono eterodimeri in cui le cicline costituiscono le subunità regolatorie e le CDK le subunità catalitiche. Il livello delle CKD si mantiene pressoché costante attraverso tutta la durata del ciclo, ma la loro attività è strettamente dipendente dall'espressione e dall'attivazione delle corrispondenti cicline, che variano con il succedersi delle fasi del ciclo cellulare (90). In presenza di un segnale mitogeno le cellule promuovono la sintesi delle cicline di tipo D, che andranno a legarsi alle CDK 4 e 6 attivandole. L'attivazione di questo complesso porta alla fosforilazione, con conseguente inattivazione, della

proteina pRb che può funzionare sia come un inibitore che come un promotore della trascrizione, in relazione ai suoi livelli di fosforilazione (91). Durante la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> del ciclo cellulare, il differenziamento terminale, la senescenza e la quiescenza la proteina pRb è ipofosforilata. Nella fase G<sub>1</sub> tardiva, e durante la fase G<sub>2</sub>/M, Rb viene invece fosforilata sui residui di serina e treonina dai complessi cicline - CDK. Nella forma ipofosforilata, pRb lega, inattivandolo, il fattore di trascrizione E2F. La fosforilazione di pRb da parte dei complessi ciclina A CDK4/6 durante la fase G<sub>1</sub> porta al rilascio del fattore E2F, che è ora libero di promuovere la trascrizione dei geni necessari per la sintesi del DNA e per l'ingresso della cellula in fase S. Vengono trascritti i geni che codificano per le cicline E, A e B, per la diidrofolato reductasi e per la timidina chinasi. Il complesso ciclina E/CDK2, regolando la transizione tra la fase G<sub>1</sub> e la fase S, è un target molto importante per il check point relativo al danno al DNA (92). È in corrispondenza di questo punto di restrizione infatti che, in presenza di un danno al DNA, viene bloccata la progressione del ciclo cellulare per consentire alle cellule di ripararlo o, in caso contrario, di attivare i processi apoptotici (93). Al termine della fase S il complesso ciclina A/CDK1 fosforila la fosfatasi Cdc45, che inattiva la CDK2, ponendo fine alla replicazione del DNA e quindi alla fase S. L'ingresso delle cellule nella fase G<sub>2</sub> è regolato dalla formazione dei complessi ciclina B/CDK1 che vengono defosforilati alla fine della fase G<sub>2</sub> da parte delle Cdc25, poco prima dell'ingresso della cellula nella fase M. In corrispondenza delle transizione G<sub>2</sub>/M si trova il secondo punto di restrizione del ciclo cellulare (94, 95). Oltre all'azione regolatoria da parte delle cicline, le CDK sono soggette anche all'azione di proteine inibitorie che, legandosi ad esse, ne inattivano la subunità catalitica. Queste proteine appartengono a due famiglie: la famiglia delle INK4, di cui fanno parte p15, p16, p18 e p19 e la famiglia delle Cip/Kip, di cui fanno parte p21, p27 e p53. La famiglia delle INK4 inibisce in maniera specifica i complessi ciclina D-

CDK4/6 durante la fase G<sub>1</sub> del ciclo cellulare, mentre la famiglia delle Cip/Kip inibisce l'attività delle CDK durante tutta la durata del ciclo cellulare (96).

La proteina p53 è una proteina che agisce da fattore di trascrizione nei confronti dei geni che controllano la risposta delle cellule ad uno stress. Alterazioni nell'attività della p53 promuovono l'accumulo di danni al DNA nelle cellule che portano alla comparsa di un fenotipo cancerogeno. Il ruolo chiave della p53 nella prevenzione dei tumori è quello di indurre l'arresto del ciclo cellulare e la senescenza (97) e di attivare l'apoptosi (98) nelle cellule che presentano un danno al DNA, fornendo quindi un'efficace barriera nei confronti degli insulti genotossici. Per questo motivo è stata definita il guardiano dell'integrità del genoma cellulare (99). Recentemente è stato inoltre dimostrato che la p53 esercita un ruolo anche nei meccanismi di riparazione del DNA, cooperando con il sistema di riparazione dei nucleotidi mediante escissione (NER) (100, 101). Questo sistema di riparazione comprende una serie di enzimi che agiscono rimuovendo dalla doppia elica del DNA le regioni danneggiate da agenti carcinogenici o chemioterapici. Il riconoscimento di queste regioni danneggiate, che si presentano come distorsioni ingombranti della doppia elica, porta alla rimozione di un breve segmento di DNA a singolo filamento, creando un gap a livello del quale si lega successivamente la DNA polimerasi che sintetizza la parte danneggiata utilizzando il filamento integro come stampo. Il ruolo della p53 in questo sistema di riparazione sembra essere quello di un sensore legato alla trascrizione, che abilita l'attività di alcuni di questi enzimi ed in particolare di quelli che appartengono al Global Genomic Repair (GGR) (102).

Nelle cellule sane la p53 ha un'emivita molto breve in quanto viene rapidamente degradata dalla proteina MDM2 a cui è legata (103, 104). Il legame con questa proteina le impedisce inoltre di migrare nel nucleo. In seguito a un danno al DNA

i livelli di espressione della p53 aumentano, essa viene fosforilata da parte di specifiche chinasi (ATM e ChK1/2), si stacca dal complesso con MDM2, migra nel nucleo e attiva la trascrizione dei geni che controllano la proliferazione cellulare e l'apoptosi. Tra questi vi sono quelli che codificano per la p21 e la proteina Rb (105, 106) le quali, come precedentemente descritto, esercitano un controllo negativo sul ciclo cellulare per GADD45A ), implicato nella riparazione del DNA, per le proteine proapoptiche FASL e Bax (107, 108) e per la trombospondina, inibitore dell'angiogenesi. La maggior parte delle mutazioni a carico della p53, che sono state riscontrate in cellule con un fenotipo tumorale, riguardano il dominio di legame con il DNA. In conseguenza di ciò la p53 non è quindi in grado di legare i geni bersaglio coinvolti nell'arresto della proliferazione cellulare e nell'induzione del processo apoptotico, promuovendone la trascrizione, e porta all'accumulo di cellule con DNA danneggiato (109).

L'apoptosi, o morte cellulare programmata, è uno dei meccanismi essenziali deputati al controllo dell'omeostasi tissutale ed è il risultato di una complessa serie di eventi a cascata sottoposti ad una fine regolazione. È un processo importante sia in condizioni fisiologiche che in condizioni patologiche (110, 111). La cellula apoptotica presenta caratteristiche morfologiche ben definite, che la distinguono dalle cellule che muoiono per necrosi. Le alterazioni morfologiche delle cellule apoptotiche riguardano sia il nucleo che il citoplasma. Nel nucleo delle cellule apoptotiche si osserva la condensazione della cromatina che prima si dispone al di sotto della membrana cellulare (marginazione) e successivamente si frammenta, portando alla riduzione del volume cellulare (pyknosis) (112), alla scomparsa degli pseudopodi e alla formazione dei corpi apoptotici (karyorrhexis) (113). All'interno dei corpi apoptotici, gli organelli citoplasmatici, quali i mitocondri, rimangono intatti. I corpi apoptotici sono inoltre circondati dalla

membrana cellulare intatta e vengono fagocitati immediatamente dai macrofagi, prima che la membrana si rompa e si possa determinare la risposta infiammatoria (112). Dal punto di vista biochimico, l'apoptosi è caratterizzata dalla successione di tre eventi: l'attivazione delle caspasi e la degradazione delle proteine e del DNA, che viene frammento prima in pezzi più grandi e successivamente in oligonucleosomi da parte delle endonucleasi (114); le modificazioni che avvengono a livello della membrana plasmatica consistono nell'esposizione della fosfatidilserina sul versante esterno, in modo da permettere il riconoscimento delle cellule apoptotiche da parte dei macrofagi (115).

Le caspasi sono un gruppo di enzimi che appartengono alla famiglia delle cisteinil-proteasi: questi enzimi sono caratterizzate dalla capacità di digerire le proteine operando dei tagli in corrispondenza di un residuo di acido aspartico (114). Una volta attivate, le caspasi agiscono su una serie di proteine fondamentali per la vita della cellula, distruggendo l'impalcatura nucleare e attivando le DNAsi, che successivamente andranno a degradare il DNA (116). Si distinguono due diversi tipi di caspasi, iniziatrici (2, 8, 9 e 10) ed esecutrici (3, 6, 7), che possono essere attivate e secondo tre vie: la via intrinseca mitocondriale, la via intrinseca del reticolo endoplasmatico, meno conosciuta, e la via estrinseca dei recettori di morte.

La via estrinseca è mediata dall'attivazione dei recettori di morte, posti sulla membrana plasmatica, da parte dei ligandi specifici, tra cui quello meglio conosciuto è il recettore TNF che lega CD95 e Fas (117). Questi recettori sul versante intracellulare presentano un dominio che riconosce e lega proteine adattatrici, come TRADD e FADD. Queste proteine possiedono infatti un death domain (DD) associato a quello dei recettori di morte. La formazione di questo

complesso ligando – recettore - proteina adattatrice, noto come complesso di segnalazione, porta all'attivazione delle caspasi iniziatrici, come la caspasi 8 (118). L'attivazione della caspasi 8 si traduce infine nell'attivazione delle caspasi esecutrici, poste a valle di questa via (119).

La via intrinseca è invece attivata da stimoli che provengono dall'interno della cellula e che possono essere costituiti dalla presenza di un danno genetico, dall'ipossia, dai radicali liberi, dalle elevate concentrazioni citosoliche di calcio e dallo stress ossidativo (119). La presenza di uno di questi stimoli si traduce nell'aumento della permeabilità del reticolo endoplasmatico e nel rilascio di proteine proapoptotiche, come il citocromo c, nel citoplasma (120). Questa via è inoltre regolata da proteine che appartengono alla famiglia della Bcl-2 e che vengono suddivise in due gruppi: le proteine proapoptotiche (Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim and Hrk) e le proteine antiapoptotiche (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 e Mcl-1) (121). Il ruolo di queste proteine è quello di modulare la permeabilità della membrana mitocondriale, promuovendo o inibendo il rilascio del citocromo c nel citosol. L'innescò dei processi apoptotici non è determinato tanto dalla quantità assoluta di queste proteine quanto piuttosto dal loro equilibrio (122). Dallo spazio intermembrana del mitocondrio vengono rilasciati nel citosol altri fattori. Tra questi ricordiamo: fattori che inducono l'apoptosi (AIF), secondi attivatori delle caspasi derivati dai mitocondri (Smac) e proteine che legano inibitori dell'apoptosi (IAP) con basso pI (DIABLO) (122, 123). In seguito al rilascio del citocromo c nel citoplasma, si ha l'attivazione della caspasi 3 come conseguenza della formazione di un complesso, noto come apoptosoma, di cui fanno parte il Citocromo c, il fattore Apaf-1 e la caspasi 9 (122). Inoltre, il complesso Smac/DIABLO, rilasciato anch'esso nel citosol, promuove l'attivazione dell'apoptosi legando le proteine inibitrici dell'apoptosi come le IAPs, che,

staccandosi dal legame con le caspasi 3 e 9, risultano libere di essere attivate (122, 123).

La via intrinseca del reticolo endoplasmatico, infine, è la meno nota. Si ritiene che la sua attivazione sia mediata dalla caspasi 12 e che sia indipendente dal mitocondrio. In presenza di un danno al RE, causato da stress ossidativo, radicali liberi o carenza di glucosio, nella cellula si riduce la sintesi proteica e si ha l'attivazione del fattore 2 associato al recettore TRF che si dissocia dalla procaspasi 12 attivandola (124).

La fase esecutrice dell'apoptosi coinvolge l'attivazione a cascata di una serie di caspasi esecutrici, che parte dalla caspasi 8 per la via estrinseca e dalla caspasi 9 per quelli intrinseca. Entrambe le vie convergono nell'attivazione della caspasi 3, nota come caspasi esecutrice, la quale agisce sugli inibitori della desossiribonucleasi attivate dalle caspasi, promuovendo il processo apoptotico (125). Le caspasi esecutrici agiscono inoltre su proteine chinasi, proteine del citoscheletro, proteine di riparazione del DNA e subunità inibitorie della famiglia delle endonucleasi. Queste proteine intervengono nella modificazione della struttura del citoscheletro, sul ciclo cellulare e sulle vie di segnalazione, e tutte insieme contribuiscono alla realizzazione dei cambiamenti morfologici del processo apoptotico (125).

L'evasione delle cellule dal processo di morte cellulare è uno dei cambiamenti responsabili della trasformazione delle cellule sane in cellule maligne. Le cellule maligne possiedono infatti diversi modi per diventare resistenti ai processi apoptotici che risultano, tra l'altro, ridotti. Le vie di evasione dal processo apoptotico sono generalmente tre: la prima riguarda la perturbazione dell'equilibrio tra le proteine pro e antiapoptotiche, come conseguenza

dell'alterazione dell'espressione dei geni che per esse codificano; la seconda riguarda la riduzione dei livelli e della funzionalità delle caspasi; infine, la terza riguarda le alterazioni delle vie di segnalazione mediate dai recettori di morte, come conseguenza di una down regulation dell'espressione dei recettori o del loro cattivo funzionamento. La down regulation dei recettori di morte è stata ad esempio indicata come una delle possibili cause di resistenza acquisita al trattamento con i farmaci chemioterapici (126).

### ***1.3. Effetti chemio preventivi dei polifenoli dell'olio di oliva***

Nella comparsa della cancerogenesi è possibile quindi identificare dei punti di controllo a livello dei quali i polifenoli dell'olio di oliva possono agire esercitando la loro azione chemio preventiva, influenzando sia la fase di iniziazione, e quindi prevenendo il danno ossidativo al DNA, che le fasi di promozione e progressione, inibendo la proliferazione e inducendo il differenziamento e l'apoptosi nelle cellule trasformate.

#### ***1.3.1. Effetti dei polifenoli sulla prevenzione del danno ossidativo al DNA e sulla fase di iniziazione.***

Il ruolo svolto dai polifenoli nella fase di iniziazione del processo di cancerogenesi è controverso. In particolare, i risultati ottenuti nel corso di studi condotti *in vitro* mostrano che questi composti possono esercitare un effetto protettivo nei confronti del danno indotto al DNA ma, in alcuni casi, possono non avere alcun effetto o addirittura un effetto opposto (127 - 130). È stato infatti dimostrato che questi composti sono in grado di prevenire il danno ossidativo indotto dal perossido di idrogeno nelle cellule di leucemia promielocitica umana HL60 (128) e nei PBMC (128, 131) in tre linee cellulari di cancro al seno (MCF10, 7 e MDA-

MB231) (132), nelle cellule di cancro al colon HT29 (133) e nelle cellule di cancro alla prostata PC3 (134). Nessun effetto antiossidante è stato invece riscontrato nei confronti dei fosfolipidi dei liposomi in presenza di Fe<sup>+3</sup> (127). Un effetto genotossico da parte di alcuni polifenoli è stato invece osservato nelle cellule di Jurkat esposte continuamente all'azione del perossido di idrogeno generato direttamente nel terreno di coltura in presenza dell'enzima glucosio ossidasi (127).

### ***1.3.2. Effetti dei polifenoli sulla fase di promozione/progressione del processo di cancerogenesi***

Per quanto riguarda invece gli effetti esercitati nei confronti del processo di promozione/progressione della cancerogenesi, i dati ottenuti indicano chiaramente che questi composti sono in grado di esercitare sia un effetto inibitore nei confronti della proliferazione cellulare, che di indurre l'apoptosi. Questi effetti sono stati osservati nel corso di studi condotti *in vitro* su linee cellulari tumorali trattate sia con i singoli componenti fenolici, che con una miscela complessa. I dati ottenuti mostrano che questi composti sono in grado di: ridurre la vitalità delle cellule di eritroleucemia umana K562 (135); ridurre la proliferazione e di arrestare il ciclo cellulare in fase G2/M nelle cellule JIMT-1, unico modello di cellule di cancro al seno che presenta una resistenza intrinseca a diversi tipi di farmaci quali trastuzumab, gefitinib, erlotinib and lapatinib (136); inibire la proliferazione nelle cellule di cancro al colon HT29 ed SW620, inducendo l'arresto del ciclo cellulare in fase S e l'apoptosi (137); ridurre la proliferazione nelle cellule di adenocarcinomi del colon bloccando il ciclo cellulare in fase G2/M (138); di ridurre la proliferazione cellulare, inducendo l'arresto in fase G2/M e l'apoptosi nelle cellule di cancro al colon RKO e HCT116

(139); inibire la proliferazione nelle cellule di leucemia promielocitica umana HL60, inducendo l'arresto del ciclo cellulare in fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> e l'apoptosi (140 - 142). Per quanto riguarda gli effetti dei polifenoli sulla fase di progressione, e in particolare sulla capacità da parte delle cellule tumorali di invadere tessuti sani, gli unici dati presenti in letteratura sono quelli sulla riduzione della capacità di invasione delle cellule HT115 (143).

#### **1.3.2.1. Idrossitirosolo**

Il composto fenolico dell'olio di oliva maggiormente studiato è rappresentato dall'idrossitirosolo, il quale è abbondantemente ed esclusivamente presente nell'olio di oliva come composto libero, legato alla forma dialdeidica dell'acido elenoico (3,4-DHPEA-EDA) e come isomero dell'oleuropeina aglicone (3,4DHPEA-EA). Dal punto di vista chimico l'idrossitirosolo è caratterizzato dalla presenza del catecolo, cioè di un anello aromatico a cui sono legati due gruppi idrossilici in posizione orto. La presenza dell'anello catecolico conferisce all'idrossitirosolo una potente attività antiossidante, in quanto esso è in grado di stabilizzare la struttura dei radicali liberi attraverso la formazione di legami a idrogeno intermolecolari (144). Sembra inoltre che i composti in cui i due gruppi idrossilici si trovano in posizione orto, piuttosto che in posizione meta o para, siano quelli dotati di maggiore attività antiossidante.

Le proprietà antiossidanti dell'idrossitirosolo sono ben conosciute. I dati presenti in letteratura mostrano infatti che esso è in grado di: agire come scavenger dei radicali liberi e di prevenire il danno ossidativo al DNA nelle cellule di cancro al seno MCF10, 7 e 3 (132); ridurre i livelli delle LDL ossidate e delle specie reattive dell'ossigeno nei PBMC trattati con TCDD (145); ridurre le rotture al DNA e il danno ai cromosomi nelle cellule HepG2 trattate con il bromato di potassio (146);

proteggere le cellule epiteliali dei pigmenti della retina dal danno ossidativo indotto dall'acroleina (147); proteggere le cellule di cheratinociti umani HaCaT dai danni indotti dalle radiazioni UV (148); prevenire quasi completamente il danno al DNA indotto dal deossivalenolo, dall'acrilamide e dal sudan I nelle cellule HepG2 (149 - 151); proteggere le cellule di timo di vitello e gli ibridomi neuronali dal danno al DNA da perossinitriti (152); proteggere le cellule renali dal danno ossidativo indotto dal perossido di idrogeno, attraverso l'inibizione delle cascate di trasduzione del segnale mediate dal ERK1/2 e JNK (153); ridurre, in presenza di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la concentrazione intracellulare di ROS nelle cellule dell'endotelio vascolare, stimolando la fosforilazione della proteina chinasi attivata dall'AMP (AMPK) e aumentando l'espressione della catalasi (154); proteggere le cellule CaCo2 dal danno ossidativo indotto dal terziar butil idroperossido (155) e dall'acrilammide (156), riducendo la generazione delle ROS; proteggere le cellule dell'epitelio tubulare renale dal danno indotto dall' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; proteggere le cellule renali LLC-PK1 dal danno ossidativo indotto dall' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (157), inibendo la produzione dei prodotti di ossidazione degli acidi grassi insaturi e del colesterolo; inibire lo stress ossidativo nelle cellule THP-1 stimulate dall'LPS (158); proteggere, *in vitro*, i tessuti cerebrali ipossici di ratto dal danno ossidativo che accompagna la riperfusione, riducendo i livelli di lattato deidrogenasi (LDH), a differenza di quanto osservato con potenti antiossidanti, come la vitamina E o la N-acetil-cisteina, che non hanno avuto nessun effetto (159); inibire il danno al DNA indotto dal perossido di idrogeno, sia nelle cellule di leucemia promielocitica umana HL60 che nei PBMC in un intervallo di concentrazioni molto basso (128). Nel corso dello stesso studio è stato inoltre dimostrato che l'effetto protettivo del DPE nei confronti del danno ossidativo al DNA veniva mantenuto anche quando le specie reattive dell'ossigeno erano prodotte dai

monociti attivati con l'estere del forbolo (PMA), mimando una condizione che è molto vicina a quelle fisiologiche (128).

Per quanto riguarda le proprietà chemio preventive dell'idrossitirosolo numerose evidenze sperimentali mostrano che questo composto è in grado di inibire la proliferazione e di indurre il processo apoptotico in diverse linee cellulari tumorali. Della Ragione et al. hanno dimostrato che l'idrossitirosolo è in grado di arrestare la proliferazione e di indurre l'apoptosi nelle cellule di leucemia promielocitica umana HL60 e nelle cellule di cancro al colon HT29. Il meccanismo attraverso il quale l'idrossitirosolo induce l'apoptosi nelle cellule in studio sembra essere mediato dal rilascio del Citocromo c e quindi dall'attivazione della via intrinseca che coinvolge la caspasi 3 (160). Altri Autori hanno inoltre dimostrato che l'idrossitirosolo è in grado di: inibire la crescita delle cellule di cancro al seno MCF7, inibendo l'attivazione estradiolo - dipendente, delle vie di segnalazione mediate dalle ERK1/2 (138); ridurre, nei ratti, la crescita dei tumori al seno indotta chimicamente dal dimetil benzantacene, con la stessa efficacia della daunorubicina ma con effetti istopatologici migliori e di interferire con la trascrizione dei geni che controllano la proliferazione e l'apoptosi e con le vie di segnalazione mediate da Wnt, promuovendo l'espressione dell'Sfp4 (161). Inoltre, in seguito al trattamento con idrossitirosolo, a una concentrazione pari a 100  $\mu$ M, si verifica una completa inibizione della crescita e l'induzione del processo apoptotico nelle cellule HL60 (140, 141). Sempre alla stessa dose l'idrossitirosolo è in grado di interferire con la normale progressione del ciclo cellulare, inibendo la transizione G1 - S e modificando i livelli basali di espressione di importanti proteine, coinvolte sia nella regolazione del ciclo cellulare che dell'apoptosi. In particolare, si è osservata una riduzione dell'espressione della chinasi ciclina dipendente 6 (CDK6) e un

aumento dell'espressione della p21 e della p27 , inibitori delle CDK (142) . Nelle cellule di cancro al seno MCF7 l'idrossitirosolo, alla concentrazione di 25 µg/ml, è stato in grado di aumentare la percentuale di cellule in fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> del ciclo cellulare, riducendo quella delle cellule in fase G<sub>2</sub>/M (162). In un range di concentrazioni compreso tra 200–400 µM il DPE è stato in grado di inibire la crescita di cellule di carcinoma del colon HT-29, HCT116, SW480 and LoVo bloccando il ciclo cellulare in fase S e G<sub>2</sub>/M (163). Il meccanismo alla base di questi effetti sembra essere attivato in risposta ad uno stress del reticolo endoplasmatico. Sulle cellule di cancro al colon CaCo2 l'idrossitirosolo è stato in grado di inibire la proliferazione attraverso l'inibizione della p38 (164). L'idrossitirosolo è stato inoltre in grado di inibire lo sviluppo dei melanomi indotti dalle radiazioni UV e degli epatocarcinomi HepG2 indotti dal terziar-butyl idroperossido (165). Altre linee cellulari tumorali, come ad esempio le cellule di cancro al seno MCF7 e SKBR3, e le cellule di melanoma umano M14, si sono rivelate abbastanza resistenti al trattamento con idrossitirosolo (166 - 168) e solo in presenza di una più alta concentrazione del fenolo (324 µM per le MCF7, 600 - 800 µM per le M14) si è osservato un effetto sulla proliferazione e sull'apoptosi.

A differenza delle ben note proprietà antiossidanti e della capacità di prevenire il danno ossidativo al DNA in un basso range di concentrazioni, compreso tra 1 e 10 µM (128), solo recentemente è stato dimostrato che le proprietà antiproliferative e proapoptotiche dell'idrossitirosolo, ad una dose pari a 100 µM, sono mediate da un'azione pro-ossidante consistente nel rilascio di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nel terreno di coltura (169). Questa caratteristica non sembra essere condivisa da altri composti fenolici presenti nell'olio d'oliva, strutturalmente simili all'idrossitirosolo. In questo contesto, in particolare, il tirosolo non sembra essere in grado di indurre né un effetto proapoptotico né accumulo di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nel terreno di coltura delle HL60,

mentre il suo derivato legato alla forma dialdeidica dell'acido elenolico (oleocantale), anche se incapace di produrre  $H_2O_2$ , si è rivelato comunque in grado di indurre l'apoptosi nelle HL60 (170). Per quanto riguarda invece la forma dialdeidica dell'acido elenolico legato all'idrossitiroloso (3,4-DHPEA-EDA), i dati ottenuti mostrano che, sebbene esso sia in grado di accumulare  $H_2O_2$  nel terreno di coltura, in presenza di catalasi l'effetto proapoptotico è comunque mantenuto (170). Infine un possibile meccanismo d'azione, descritto recentemente, coinvolge i catetolo-chinoni che si originano nel corso di reazioni di ossidoriduzione e che possiedono diverse proprietà simili a quelle dei chinoni elettrofilari, compresa la capacità di formare addotti di Michael con i tioli nucleofili delle cellule e in particolare con quelli presenti sulle cisteinilproteine (171). Rispetto ai chinoni del tocoferolo di natura lipofila, i chinoni che si originano dall'idrossitiroloso sono di natura idrofila e possono essere detossificati molto più rapidamente in seguito alla reazione con i tioli nucleofili del GSH (172). Grazie alla loro natura idrofila, i chinoni dell'idrossitiroloso sono in grado di reagire con i tioli nucleofili localizzati su enzimi e proteine nell'ambiente idrofilo intracellulare, dando vita a una gamma più vasta di effetti biologici rispetto a quelli che derivano dai chinoni lipofili dei tocoferoli, che sono esclusivamente localizzati a livello della membrana cellulare (173, 174). La reazione di addizione di Michael tra i chinoni elettrofilari e i tioli nucleofili è stata dimostrata da molti autori che hanno messo in evidenza la formazione di un addotto tiolico con la N-acetilcisteina (NAC), il GSH e numerose proteine in cui i residui di cisteina sono facilmente accessibili (175).

Nell'ambito della chemioprevenzione il ruolo giocato dalla formazione degli addotti di Michael, come conseguenza della reazione tra i chinoni elettrofilari e i tioli nucleofili, sembra essere legato al ruolo che questi addotti hanno nella via in

comune tra cancro e processi infiammatori, mediata dall'NF-kB. Da tempo è infatti noto che l'infiammazione contribuisce all'insorgenza del 15-20% dei tumori totali (176, 177) ed è stato dimostrato inoltre che, l'aumento della sintesi dell'NF-kB nelle cellule infiammatorie, promuove la crescita delle cellule tumorali, inibendone l'apoptosi e aumentandone la capacità di invasione dei tessuti sani (177 - 179). L'NF-kB gioca anche un ruolo chiave nell'aumento della sintesi delle cellule di soppressione di derivazione mieloide, mediata dall'IL-1 e dalle prostaglandine (180 ,181). Queste cellule, la cui quantità aumenta in presenza di una massa tumorale e durante i processi infiammatori e le infezioni, sono potenti inibitori dell'attività antitumorale mediata dalle cellule T (181). La formazione degli addotti di Michael tra i chinoni dell'idrossitirosole e l'NF-kB, inibendo l'attività di questo fattore di trascrizione, riduce la proliferazione delle cellule tumorali e ne attiva l'apoptosi.

#### ***1.3.2.2. Derivati organosolforici di sintesi dell'idrossitirosole***

Alcuni alimenti di origine vegetale appartenenti alla famiglia Allium e Cruciferus, tra cui aglio, cipolla, scalogno, erba cipollina, porri e broccoli, contengono una complessa e interessante serie di composti organo solforici, che sono stati indicati come possibili agenti chemiopreventivi (182 - 185). Gli studi condotti hanno riguardato in particolare l'allil mercaptano (AM), il di-allil disolfuro (DADS), l'S-allil-cisteina (SAC), l'S-allil-mercaptocisteine (SAMC) e l'allicina. Nel corso di questi studi e' stato dimostrato che, nelle cellule tumorali, questi composti hanno la capacità di inibire gli enzimi preposti alla deacetilazione degli istoni (186). Studi condotti in vitro su cellule di cancro al colon, hanno messo in evidenza che l'AM è in grado di indurre l'iperacetilazione dell'istone H3, facilitando il legame della p53 al promotore per la p21, arrestando la crescita delle cellule tumorali

(187-191); il DADS è stato in grado di arrestare il ciclo cellulare mediante l'attivazione delle fosfatasi Cdc25 le quali inibiscono l'attività dei complessi ciclina-CDK (192); un effetto simile è stato dimostrato anche per il DADS, il quale ha indotto il blocco del ciclo cellulare in fase G2/M, mediante l'inibizione, Cdc25-dipendente, della ciclina B1 e l'attivazione della via di segnalazione, mediata da ATR, che porta all'aumento della fosforilazione della p53 e dei livelli di espressione della p21 (192). Risultati ottenuti nel corso di studi condotti precedentemente hanno dimostrato che alcuni derivati di sintesi dell'idrossitirosolo hanno la capacità di agire come agonisti dei recettori della dopamina (metil solfidi, metil solfoni, solfossidi e solfoni) o sono stati utilizzati per la preparazione di recettori sintetici per la dopamina (allil idrossitirosolo disulfide) (193, 195); altri ancora infine sono stati impiegati con successo nel trattamento delle nefriti (diidrossitirosolo disulfide). Per quanto riguarda le proprietà chemioreventive di questi composti nessun dato è al momento disponibile. I derivati organosolforici dell'idrossitirosolo sono stati ottenuti mediante una reazione di sintesi nel corso della quale, gruppi funzionali quali tioli, tioacetati e disolfidi, sono stati legati alla struttura catecolica dell'idrossitirosolo. La sintesi di questi composti ha avuto come scopo quello di testare, per la prima volta, l'esistenza di un effetto chemiopreventivo combinato tra il catecolo dell'idrossitirosolo e i gruppi funzionali organo solforici.

### **1.3.2.3. Lignani**

Un'altra classe di composti fenolici presenti nell'olio di oliva e oggetto di grande interesse è quella dei lignani. Questi composti presentano una enorme diversità strutturale e molteplici attività biologiche (196). Dal punto di vista chimico i lignani sono difenoli che derivano dalla dimerizzazione di due unità

fenilpropanoidi. Sebbene siano particolarmente abbondanti nei semi di lino e nei semi di sesamo, quelli assunti con la dieta (secoisolariciresinolo, matairesinolo, lariciresinolo e pinoresinolo) provengono principalmente da alimenti di origine vegetale ricchi di fibre, come cereali integrali, legumi, frutta e verdura (197). Oltre il 75% dell'assunzione giornaliera è comunque rappresentata da lariciresinolo e pinoresinolo (198). I possibili effetti benefici dei lignani sulla salute umana dipendono, in larga parte, dalla flora batterica intestinale che li converte negli enteroligani, enterodiolo ed enterolattone (199). Dal punto di vista farmacologico, questi composti possono essere infatti considerati fitoestrogeni o composti simil-estrogenici, la cui azione è mediata dal legame con i recettori per gli estrogeni ER  $\alpha$  e  $\beta$  (200). I ligandi per questi recettori possono agire come agonisti, sia puri che parziali, o come antagonisti in relazione al tessuto in cui i recettori sono localizzati. In seguito all'attivazione dei recettori ER vengono innescate delle cascate di trasduzione del segnale che culminano nel controllo dell'espressione di geni regolatori della crescita cellulare, della proliferazione e del differenziamento (201). Elevati livelli plasmatici di enterolignani sono stati associati all'inibizione della carcinogenesi mammaria nei ratti (202) e, nel corso di studi condotto in vitro, queste molecole sono state inoltre in grado di inibire la proliferazione delle cellule tumorali del colon, della prostata e della mammella (203, 204). Le proprietà antitumorali dei lignani sono state recentemente messe in evidenza da uno studio condotto su 49 tipi di lignani strutturalmente diversi (205). Nel corso di questo studio è emerso tra l'altro che l'arctina, presente nella bardana (*Artctium lappa*), possiede un effetto antiproliferativo sulle cellule di cancro alla prostata PC-3 mediato dall'aumento dell'espressione della mucina MUC-1, una proteina anti adesiva che promuove il distacco delle cellule dal loro substrato (206); matairesinolo, arctina e arctigenina sono in grado di ridurre la crescita

delle cellule di cancro del colon SW480, attraverso l'inibizione della via di segnalazione mediata da Wnt/b-catenina [207]; il matairesinolo è in grado di indurre l'apoptosi mediata dal Tumor necrosis factor Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL), nelle cellule tumorali della prostata LNCaP riducendo l'attività di Akt (208); il 7-idrossimatairesinolo si è rivelato in grado di inibire nei topi Athymic nude la crescita di xenotrapianti ottenuti a partire da cellule tumorali della prostata LNCap, aumentando l'apoptosi e riducendo l'indice di proliferazione della massa tumorale (209); la sesamina ha indotto l'arresto della crescita in cellule di cancro alla mammella MCF-7 bloccando la corretta progressione del ciclo cellulare in fase G1 riducendo l'espressione della ciclina D1 (210); matairesinolo è in grado di esercitare un potente effetto citotossico sulle cellule di leucemia promielocitica umana HL60, arrestandone la proliferazione e inducendo l'apoptosi con un meccanismo dose-dipendente che sembra essere legato all'induzione del danno al DNA (211); sulle stesse cellule inoltre, macelignano, oleiferina, licarina A e acido meso-diidroguaiaretico, sono stati in grado di indurre l'apoptosi attraverso l'attivazione della caspasi 3 mentre, nelle cellule HT29 ed MCF-7, essi sono stati in grado di inibire l'attività della DNA topoisomerasi I e II (212, 213).

Alla luce dei risultati ottenuti sembra quindi che i lignani siano possibili candidati utili nella chemioprevenzione. Di contro, pochi sono i dati esistenti in letteratura riguardo gli effetti benefici del pinoresinolo, il più abbondante lignano dell'olio di oliva. Dal punto di vista chimico il pinoresinolo è un dimero dell'alcool coniferilico ed è inoltre il precursore diretto di molti lignani assunti con la dieta (214). Possiede un buon potere antiossidante in quanto è in grado di neutralizzare il radicale ossidrilico e di proteggere le cellule MCF-7 dalla tossicità indotta dal perossido di idrogeno (215). L'attività antiossidante del pinoresinolo è stata anche

dimostrata verso il DPPH (Difenile Picrylhydrazyl), i radicali liberi e gli anioni superossido (215). Studi condotti in vitro hanno messo inoltre in evidenza che il pinoresinolo è in grado di attenuare le risposte infiammatorie nelle cellule di microglia dei ratti e nei macrofagi attivati dall'LPS, inibendo rispettivamente la produzione di mediatori dell'infiammazione (NO, PGE<sub>2</sub>) e di citochine pro-infiammatorie (TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6). Le proprietà anti-infiammatorie del pinoresinolo sono state anche osservate "in vivo" su topi trattati con tetracloruro di carbonio (CCl<sub>4</sub>): in seguito al trattamento con pinoresinolo alla dose di 50 e 100 mg/kg si è infatti osservata una riduzione a livello epatico dei livelli di TNF- $\alpha$ , NO-sintasi e cicloossigenasi-2 (216). Pochi e discordanti sono invece i dati relativi agli effetti chemiopreventivi del pinoresinolo. Studi condotti su quattro diverse linee cellulari tumorali (A549, SK-OV-3, SK-MEL-2 e HCT15) hanno infatti messo in evidenza che, in seguito al trattamento di queste linee cellulari con pinoresinolo, a una dose compresa tra 26-30 mg/mL, si aveva una riduzione della proliferazione nella popolazione cellulare pari al 50% dopo 72 ore (217), mentre, nessun effetto è stato rilevato sulle cellule stesse in un altro studio (218). Uno studio condotto recentemente (219) ha inoltre dimostrato che una miscela di estratti polifenolici, ottenuti dall'olio di oliva e ricca in pinoresinolo, è stata in grado di inibire la proliferazione e di indurre l'apoptosi nelle cellule tumorali del colon. Particolarmente sensibili agli effetti citotossici del pinoresinolo si sono rivelate le cellule RKO e HCT116 che hanno p53 funzionante. Di contro, dati ottenuti da altri Autori che hanno testato 14 diversi estratti fenolici su cellule di cancro al seno SKBR3, p53 mutate, hanno messo in evidenza l'esistenza di una correlazione negativa tra la concentrazione di lignani e gli effetti anti-proliferativi e pro-apoptotici dei diversi estratti fenolici (220, 221).

#### **1.4. Chemioresistenza**

Il fenomeno della resistenza multipla o MDR è una delle principali cause del fallimento della terapia farmacologica del cancro ed è dovuto alla comparsa ed alla selezione di un subclone di cellule resistenti al trattamento con farmaci chemioterapici, chimicamente e strutturalmente non correlati tra di loro (222, 223). Anche se il fenomeno della resistenza agli antiblastici sembra essere multifattoriale, in quanto è il risultato di una serie di meccanismi che comprendono l'inattivazione del farmaco, l'alterazione di specifici targets e dei processi di riparazione del DNA (224), l'alterazione dei meccanismi di regolazione dell'apoptosi (225), la più importante causa che porta alla comparsa della resistenza multipla è la sovraespressione, da parte delle cellule tumorali, di alcune proteine transmembrana appartenenti alla famiglia delle ATP Binding Cassette Transporters (ABC) e in particolare della P-glicoproteina GP170 (226, 227). Le ATP Binding Cassette Transporters mediano l'efflusso di una grande varietà di composti, attraverso le membrane, sia in condizioni fisiologiche che patologiche (228, 229). Agiscono infatti sulla regolazione dell'omeostasi dei lipidi e degli ioni (230-232); partecipano alle risposte immunitarie, mediando il trasporto nel reticolo endoplasmatico dei prodotti della degradazione proteosomiale, che verranno successivamente presentati alle cellule del sistema immunitario dal complesso maggiore di istocompatibilità (233); regolano la permeabilità ematica delle membrane a livello di specifici organi quali il cervello (234), la placenta (235) i reni (236, 237), il fegato (238) e il tratto intestinale (239) (regolazione della forma intrinseca di MDR); infine, provvedono all'escrezione delle tossine prodotte nell'organismo. Dal punto di vista strutturale sono composte da due domini citoplasmatici, che legano e idrolizzano l'ATP, e due domini transmembrana con una struttura ad  $\alpha$ -elica, a livello dei quali sono

localizzati i siti di legame per i diversi ligandi (240 - 243). La regolazione dell'espressione di queste proteine è determinata a vari livelli, sia trascrizionali che trasduzionali, sebbene il punto di regolazione più importante si trovi a livello della trascrizione (244). L'aumento della trascrizione del gene MDR1, identificato per la prima volta nel 1986 in cellule KB selezionate con la vinblastina (245), può essere indotta da diversi fattori, quali agenti chemioterapici, radiazioni ultraviolette, induttori del differenziamento, esteri del forbolo e carcinogeni attraverso diverse vie (246). Una di queste coinvolge ad esempio l'attivazione dei recettori nucleari di tipo  $\alpha$  per i retinoidi, implicati nel controllo della proliferazione cellulare, del differenziamento e dell'apoptosi (247, 248); un'altra via di controllo è quella mediata dall'oncogene Ras: è stato infatti dimostrato che l'introduzione del gene che codifica per Ras in diverse linee cellulari, sia umane che murine, porta ad un aumento dei livelli di trascrizione del gene MDR1 (249, 250). La presenza di mutazioni a livello dei geni che codificano per le BCA è stata riscontrata in diciannove malattie genetiche, tra cui la fibrosi cistica, la colestasi intraepatica e l'adrenoleucodistrofia (251). Il ruolo che queste proteine giocano nelle neoplasie umane è ben documentato. Funzionando come pompe di efflusso ATP-dipendenti, estrudono attivamente i farmaci antiblastici fuori dalle cellule, non permettendo così a questi di raggiungere concentrazioni intracellulari citotossiche. Il fenomeno della riduzione dell'accumulo dei farmaci all'interno delle cellule può essere determinato sia da una diminuzione della quantità di farmaco in ingresso, che da un aumento di quella in uscita. La maggior parte dei farmaci chemioterapici entra all'interno delle cellule mediante diffusione passiva, per cui un'alterazione nella quantità in ingresso è di solito dovuta a modificazioni nella struttura della membrana. Infatti, le cellule resistenti al trattamento con i farmaci chemioterapici hanno una struttura lipidica differente da quelle sensibili,

che può modificare sia il trasporto del farmaco che le vie estrinseche di segnalazione che controllano l'apoptosi (252). I dati relativi alla riduzione della quantità di farmaco in ingresso sono piuttosto scarsi e questo fenomeno non è molto considerato ai fini della riduzione della concentrazione del farmaco all'interno delle cellule. Di contro, il fenomeno dell'aumento della sua estrusione è invece ben documentato, così come è ben documentato il ruolo che le ABC transporters hanno nella sua regolazione. Una delle proteine ABC transporters maggiormente studiate è la P-glicoproteina 170, la quale media la farmaco resistenza a diversi tipi di chemioterapici. L' overespressione di questa proteina è infatti spesso associata ad un esito fatale delle neoplasie e l'aumento del numero di casi in cui è stata riscontrata questa overespressione, rende conto del ruolo ricoperto dalla resistenza MDR nel fallimento delle terapie farmacologiche contro il cancro (253, 254). Un grande interesse è quindi riservato allo studio delle vie attraverso le quali è possibile inibire l'attività di questa proteina, portando alla reversione del fenomeno della resistenza. Nel corso di questi studi è emerso che diverse classi di composti sono in grado di revertire la MDR P-Gp dipendente, tra questi gli inibitori dei canali del calcio come il verapamil e il nifeldipin, farmaci ipotensivi come la reserpina, antibiotici come le cefalosporine, immunosoppressori come la ciclosporina A e i suoi derivati e diversi altri composti lipofili. Tutti questi composti, oltre che essere di natura lipofila, sono accomunati dal fatto di avere come struttura base un anello aromatico, al quale sono legati sostituenti a basso peso molecolare (255). Alcuni di essi inoltre, come ad esempio il verapamil, si comportano da antagonisti competitivi per il sito di legame del farmaco. Il problema legato all'uso di questi composti è che il loro effetto è di solito selettivo e diretto nei confronti di uno o pochi farmaci: il verapamil, ad esempio, sebbene sia in grado di revertire la resistenza delle cellule al trattamento con la

vinblastina, non ha nessun effetto nei confronti della doxorubicina (256). Inoltre, queste molecole, alle dosi utilizzate, sono tutte dotate di un potenziale tossico molto elevato. In questo contesto, studi recenti hanno messo in evidenza gli effetti di alcuni composti naturali, dotati di maggiore efficacia e di minori effetti tossici anche ad alte dosi, come potenziali modulatori del fenomeno dell'MDR. I dati ottenuti hanno dimostrato che nelle cellule KB-V1 resistenti al taxolo, vinblastina e colchicina, gli estratti della radice *Stremona curtiis* sono stati in grado di revertire, in maniera dose-dipendente, la resistenza MDR (257); gli estratti del rizoma dell'*Alisma orientalis*, utilizzati in combinazione con actinomicina D, puromicina, taxolo, vinblastina e doxorubicina, alla stessa concentrazione del verapamil, hanno avuto un effetto sinergico sull'inibizione della proliferazione di cellule Hep-G2DR e K562 DR che overesprimono la P-Gp (258); nelle cellule HL60 resistenti alla adriamicina, i lignani sono stati in grado di inibire i livelli di espressione della proteina 1, associata alla MDR (259); l'epigallo catechina gallato è stata in grado di potenziare l'efficacia della doxorubicina e di aumentarne la concentrazione nelle cellule resistenti KB-A1, interferendo con il legame dell'ATP alla proteina e bloccando di conseguenza l'estrusione del farmaco dalle cellule (260); nelle cellule di leucemia murina L1210 resistenti alla adriamicina, la curcumina è stata in grado di inibire la trascrizione del gene MDR1 riducendo i livelli di espressione della P-gp (261). Una classe di composti naturali alla quale è stata riservata grande attenzione è infine quella dei flavonoidi. È stato infatti dimostrato che queste molecole sono in grado di interagire sia con i siti di legame per l'ATP, che con la porzione idrofobica della P-gp (262). Biocianina A, fisetina, morina, naringenina, quercetina e silmarina si sono rivelate efficaci nel trattamento in vitro delle cellule di cancro al seno MCF7 sensibili e resistenti alla adriamicina (263). La biocianina A in particolare è stata la più efficace nel

determinare l'accumulo di farmaco all'interno delle cellule potenziandone la citotossicità, mentre quercetina e silmarina hanno avuto un effetto simile a quello del verapamil (263). L'assenza o la ridotta presenza di tossicità legata all'uso di questi composti, unita all'efficacia che essi hanno dimostrato, ci induce quindi a considerare queste classi di molecole naturali come potenziali modulatori nella reversione delle resistenza MDR (264).

## **2. MATERIALI E METODI**

### ***2.1 Materiali***

I terreni di coltura RPMI 1640, MEM, McCOY'S, RPMI 1640 + HEPES, D-MEM e siero fetale bovino (FCS) sono stati ottenuti dalla Gibco (Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Scotland). Penicillina/Streptomicina e Glutamina sono stati acquistati dalla Sigma (Sigm-Aldrich Inc. St.Louis, MO USA ).

L'Idrossitirosolo è stato ottenuto dalla Cayman Chemicals Ltd. (United States), come soluzione in etanolo (EtOH) alla concentrazione di 320 mM e conservato a -20°C e al riparo dalla luce. Il composto è stato quindi diluito in RPMI 1640 alle concentrazioni desiderate subito prima dell'uso.

Il Pinoresinolo è stato ottenuto dalla ArboNova (Turku, Finland), come polvere (100mg) che è stata poi risospesa in etanolo assoluto, in modo da ottenere una soluzione 35 mM che è stata aliquotata e conservata a -80°C. Le concentrazioni desiderate sono state ottenute a partire dalla soluzione 35 mM con diluizioni successive in EtOH.

Gli Estratti Fenolici ottenuti da oli extravergini di oliva di quattro diverse cultivar (Ogliarola, Coratina, Nocellara e Taggiasca) sono stati forniti dal Professor Maurizio Servili della Facoltà di Scienze Economiche ed Estimative dell'Università degli Studi di Perugia, come soluzione in EtOH, conservati a -20 °C e al riparo dalla luce. La concentrazione dei fenoli totali in ogni estratto era pari a 5mg/ml. Le concentrazioni desiderate erano ottenute diluendo gli estratti nel terreno di coltura immediatamente prima dell'uso. La composizione fenolica degli estratti è riportata in Tabella 1.

I derivati di sintesi Disulfide (DS), Tiolo (TS) e Tioacetato (TA) dell'Idrossitirosolo, sono stati forniti dal professor J.M. Bolanos, dell'Università di Siviglia come polvere, che è stata poi risospesa in dimetilsolfossido (DMSO) in modo da ottenere un soluzione 10mM che è stata poi ali quotata e conservata a -20 °c e al riparo dalla luce. Le concentrazioni desiderate sono state ottenute a partire dalla soluzione madre (10mM) con diluizioni successive in DMSO immediatamente prima dell'uso.

L'ATRA è stato risospeso in dimetilsolfossido (DMSO) in modo da ottenere una soluzione madre 6.6 mM, che è stata aliquotata e conservata a -20 °C. La concentrazione desiderata nel terreno di coltura (1µM) è stata ottenuta diluendo la soluzione madre in DMSO alla concentrazione di 1 mM e aggiungendo tale soluzione direttamente al terreno (1 µl/ml) in modo da avere un concentrazione di solvente (DMSO) pari a 0,1 %.

Tutte le soluzioni sono state sterilizzate mediante filtrazione con filtri da 0.22 µm (Celbio S.r.l., Milano).

Tutti gli altri reagenti sono stati acquistati dalla Sigma (Sigma-Aldrich CO. Ltd., Irvine, UK), salvo diversamente specificato

Le cellule di leucemia promielocitica umana HL60 e HL60 R e le cellule di eritroleucemia umana K562 sono state gentilmente fornite dalla Dottoressa Stefania Grimaudo e dal Dottor Manlio Tolomeo dell'Università Degli Studi Di Palermo. Le cellule di cancro al colon HCT116 ed SW480, le cellule di cancro al seno MCF-7 ed MDA-MB231 e le cellule di cancro alla prostata LNCap e PC3 sono state acquistate dall'American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). Le colture cellulari e i trattamenti sono stati allestiti utilizzando fiasche da 75cm<sup>2</sup>, 25cm<sup>2</sup> e piastre da 24 e 96 wells. Le cellule sono state incubate a 37°C e al 95% di aria e 5% di CO<sub>2</sub> in atmosfera umidificata e mantenute in terreno RPMI 1640 completo (HL60, HL60R e K562) o DMEM (HCT116, SW480, MCF-7, MDA-MB231, LNCap e PC3) addizionato con FCS (10% v/v), L-glutamina 2.0 mM, penicillina 100U/ml e streptomicina 100µg/ml. Le cellule sono state subcoltivate 2 volte a settimana e la loro vitalità è stata valutata con il metodo di esclusione del trypan blu. La vitalità delle cellule mantenuta in coltura valutata con tale metodo è sempre maggiore o uguale al 90%.

## **2.2. Trattamenti cellulari**

Le cellule HL60 e HL60R sono state seminate in terreno completo alla densità di  $0,2 \times 10^6$  cellule/ml. Le HL60 sono state incubate a 37°C e 5% di CO<sub>2</sub> in presenza di concentrazioni crescenti di estratti fenolici (1.25, 2.5 e 5 µg/ml), idrossitiroso (100µM); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0-10µM); di pinoresinolo (1-10-100 µM) o di Acido-Trans-Retinoico (ATRA, 1µM). Le HL60 e le HL60 R sono state incubate a 37°C e 5% di CO<sub>2</sub> in presenza di disulfide (12.5, 25, 50 e 100µM), tiolo e tioacetato (50 e 100µM). Le cellule K562 sono state seminate alla densità di  $0.5 \times 10^5$  cellule/ml e

incubate a 37°C e 5% di CO<sub>2</sub> in presenza di concentrazioni crescenti di pinoresinolo (1-10-100 µM), di sodio butirrato (NaB) 2.4mM e citosina arabinoside (Ara-C) 1µM . Le cellule HCT116 e SW480 sono state seminate alla densità di 0.5x10<sup>4</sup>/ml in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) completo e incubate a 37°C e 5% di CO<sub>2</sub> in presenza di idrossitirosolo, disulfide, tiolo e tioacetato dell'idrossitirosolo (25, 50, 75 e 100µM). Le cellule HCT116, SW480, MCF-7, MDA-MB231, LNCap e PC3 sono state seminate alla densità di 0.5 x10<sup>4</sup> cellule/ pozzetto in presenza di pinoresinolo 1, 10 e 100µM.

### ***2.3. Valutazione della proliferazione***

#### ***2.3.1 Metodo del Trypan Blue***

Al termine di ogni periodo di incubazione, la proliferazione è stata valutata mediante il metodo di esclusione al trypan blue. prelevando un'aliquota della sospensione cellulare (10 µl) la quale è stata aggiunta a una soluzione di Trypan Blue (90 µl, 200 mg/ml). Nel caso in cui la densità cellulare risultava troppo elevata veniva effettuata una ulteriore diluizione 1:10. Dopo 5 minuti di incubazione a temperatura ambiente, una aliquota (10 µl) di tale sospensione cellulare è stata introdotta nella camera di Burker e le cellule sono state contate usando un microscopio ottico.

#### ***2.3.2 Test colorimetrico dell'MTT (bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio)***

Per la valutazione della vitalità cellulare delle cellule HL60, HCT116, SW480, MCF-7, MDA-MB231, LNCap e PC3 è stato utilizzato il test dell'MTT (266). Le cellule sono state seminate alla densità di 0.5 x 10<sup>4</sup> cellule/ml in piastre da 96 pozzetti. Al termine di ogni periodo di incubazione, il terreno è stato rimosso e

sostituito con 100µl di una soluzione di MTT, 0.5 mg/ml in HBSS (Hank's Balanced Salt Solution). Le cellule con la soluzione di MTT sono state incubate per due ore. Al termine del periodo di incubazione l'MTT è stato rimosso e sostituito con 100 µl di soluzione di lisi costituita da 0,1M di HCl in isopropanolo allo scopo di lisare le cellule e i cristalli di formazano che si formano a seguito della riduzione mitocondriale dell'MTT. Poichè il numero di cellule presenti nei campioni è direttamente proporzionale ai valori di assorbanza letti alla lunghezza d'onda di 550nm mediante un lettore di piastra (Anthos) da questi valori si può risalire al numero di cellule presenti nel campione. I valori di assorbanze dei vari campioni sono stati corretti sottraendo da essi il valore del bianco calcolato come la media dei valori di assorbanza di tutti i pozzetti perimetrali contenenti solo terreno. Gli effetti sulla crescita delle cellule sono stati quantificati come riduzione percentuale del valore di assorbanza del campione rispetto a quello di controllo, posto come 100.

#### ***2.4 Valutazione dell'apoptosi***

La percentuale di cellule apoptotiche è stata determinata sia mediante conta con il microscopio a fluorescenza, che mediante citometria a flusso come riportato in letteratura (267).

##### ***2.4.1. Microscopia a fluorescenza***

La determinazione dell'apoptosi mediante microscopia a fluorescenza è stata determinata prelevando 200 µl della sospensione cellulare che sono stati centrifugati a 1300 rpm per 6 minuti. Il pellet cellulare è stato quindi risospeso in 20 µl di RPMI completo a cui sono stati aggiunti immediatamente prima dell'uso l'Hoechst 33342 (4 µl/ml di RPMI prelevati da una soluzione madre di 20 µg/ml

in tampone fosfato PBS:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10mM,  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$  10mM, KCL 2,7mM, NaCl 120mM,  $\text{CaCl}_2$  0,133g/l,  $\text{MgCl}_2$  0,1 g/l, pH finale 7.3) e ioduro di propidio (IP) (20  $\mu\text{l}/\text{ml}$  di RPMI prelevati da una soluzione madre di 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in PBS) in RPMI 1640. Dopo 5 minuti di incubazione a temperatura ambiente, le cellule sono state esaminate al microscopio a fluorescenza (dotato di una lampada a mercurio da 50-W) munito di apposito filtro per la visualizzazione dei fluorocromi. L'Hoechst (HO) è un composto permeabile alla membrane plasmatica ed è quindi in grado di diffondere liberamente, raggiungere il nucleo e colorare di blu il DNA. Di contro, lo ioduro di propidio (IP) essendo altamente polare, non attraversa le membrane intatte ma è in grado di attraversare solo quelle danneggiate, colorando di rosso il DNA delle cellule che hanno perso la funzionalità della membrana. Di conseguenza, le cellule vive saranno identificate per mezzo dei loro nuclei intatti che si coloreranno di blu (HO) e le cellule necrotiche per mezzo dei loro nuclei intatti che si coloreranno di rosso (IP). Le cellule apoptotiche verranno identificate per mezzo dei loro nuclei frammentati, che mostreranno una colorazione blu (HO) o rossa (IP) in relazione dello stadio del processo apoptotico, precoce, se la membrana è integra, e tardivo, se la membrana ha perso la semipermeabilità. Per ogni condizione sperimentale sono stati preparati tre vetrini e sono state contate 100 cellule per ogni vetrino.

#### ***2.4.2 Analisi del picco Sub G1***

Per il saggio del Sub-G1, le cellule sono state colorate con IP come segue:  $0,5 \times 10^6$  cellule sono state prelevate dalla sospensione cellulare, centrifugate a 1300 rpm per 6 minuti e quindi risospese in 10 ml di PBS. Dopo aver centrifugato nuovamente la sospensione cellulare a 1300 rpm per 6 minuti il pellet è stato risospeso in 0,5 ml di una soluzione ipotonica del fluorocromo contenente: 50

$\mu\text{g/ml}$  di IP in 0,1 % sodio citrato e 0.1% di Triton X-100. I campioni sono stati poi conservati in ghiaccio e al buio per 30 minuti e quindi la fluorescenza del IP dei singoli nuclei è stata determinata mediante citofluorimetro (FACScan).

### ***2.4.3 Saggio dell'Annessina V***

Per il saggio dell'Annessina V,  $1 \times 10^6$  cellule sono state prelevate dalla sospensione cellulare e centrifugate a 1300 rpm per 6 minuti e risospese in 1 ml di PBS. Dopo aver centrifugato a 1200 rpm ( $4^\circ\text{C}$ ) per 15 minuti, il pellet è stato risospeso in 500  $\mu\text{l}$  di Binding Buffer 1X (componente del kit fornito dalla ditta produttrice). Da questi sono stati prelevati 100  $\mu\text{l}$  per ogni campione, trasferiti nei tubi da citofluorimetro e incubati in ghiaccio e al buio per 15 minuti dopo aver aggiunto 0,5  $\mu\text{l}$  della soluzione di Annessina e 5  $\mu\text{l}$  della soluzione di IP (entrambe le soluzioni sono state fornite dalla ditta produttrice del kit). Al termine del periodo di incubazione, sono stati aggiunti 400  $\mu\text{l}$  di Binding Buffer e dopo 30 minuti la fluorescenza delle cellule è stata determinata mediante il citofluorimetro (FACScan).

### ***2.5 Dosaggio della concentrazione di $\text{H}_2\text{O}_2$ nei terreni di coltura***

La concentrazione dell' $\text{H}_2\text{O}_2$  nei terreni di coltura è stata dosata mediante il metodo dell'ossidazione degli ioni ferrosi e dello xilenolo orange (268) come segue : a 20  $\mu\text{l}$  del terreno di coltura sono stati aggiunti 200  $\mu\text{l}$  della miscela di reazione contenente 250  $\mu\text{M}$  ammonio ferro(II) solfato, 25 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 100 mM sorbitolo and 125  $\mu\text{M}$  xilenolo orange e incubate a temperatura ambiente per 30 minuti. L'assorbanza è stata quindi letta a 595 nm allo spettrofotometro e la concentrazione di  $\text{H}_2\text{O}_2$  è stata ottenuta mediante una curva standard costruita aggiungendo diverse concentrazioni di  $\text{H}_2\text{O}_2$  all'RPMI subito prima del saggio.

## ***2.6 Analisi del ciclo cellulare***

0.5x 10<sup>6</sup> cellule sono state prelevate da ciascun campione e centrifugate a 1600 rpm per 6 minuti, risospese in 1 ml di PBS con EDTA (acido etilendiamminotetraacetico), fissate con 3 ml di etanolo assoluto, aggiunto goccia a goccia e incubate per almeno 1 h a -20 °C e al buio. Al termine del periodo di incubazione, i campioni sono stati centrifugati a 1600 rpm per 10 minuti. Il pellet cellulare, risospeso in 1 ml di PBS con EDTA, è stato sottoposto a un'ulteriore centrifugazione a 1600 rpm per 6 minuti e infine risospeso in 1 ml di PBS contenente 50 µg/ml di IP e 0.66 µl/ml di RNasi. Dopo 1 h di incubazione i campioni sono stati trasferiti nei tubi da citofluorimetro per la valutazione della fluorescenza

## ***2.7 Determinazione del differenziamento***

### ***2.7.1. Test della riduzione dei sali di nitro blu di tetrazolio (NBT-TEST) per il differenziamento delle HL60***

Il test della riduzione dei sali di NBT è basato sulla riduzione dei sali di NBT a formazano, da parte dei fagociti attivati. In conseguenza dell'attività fagocitaria, la cellula attiva infatti particolari meccanismi biochimici, finalizzati all'eliminazione del patogeno. Tra questi, il principale è il respiratory burst, che porta alla produzione di radicali superossido, radicali idrossilici e perossido di idrogeno. Uno degli enzimi coinvolti nella produzione di queste specie radicaliche dell'ossigeno è la NADPH ossidasi, che catalizza la produzione di superossido a partire da ossigeno e da NADPH. L'NBT solubile, messo a contatto con i fagociti, penetra all'interno delle cellule con le particelle fagocitabili e viene ridotto formando il formazano, che è riconoscibile sia al microscopio ottico, che dosabile

spettrofotometricamente dopo lisi delle cellule e solubilizzazione con opportuni solventi organici. Il test dell'NBT è stato allestito allo scopo di valutare l'eventuale effetto differenziante del pinoselinolo sulle cellule di leucemia promielocitica umana HL60, misurando l'attività enzimatica della NADPH-Ossidasi in presenza di PMA (forbolo 12-miristato 13-acetato) che attiva l'enzima stesso (269, 270).

#### ***2.7.1.1 Dosaggio spettrofotometrico***

$2 \times 10^6$  cellule sono state prelevate da ogni fiasca dopo 96 h di trattamento e centrifugate per 6 minuti a 1300 rpm. Dopo aver scartato il surnatante, le cellule sono state lavate una volta con PBS a pH 7.3 e centrifugate di nuovo a 1300 rpm per 6 minuti. I pellet sono stati quindi risospesi in 1 ml di RPMI completo a cui sono stati aggiunti 100  $\mu$ l/ml di una soluzione di NBT 12,2 mM in H<sub>2</sub>O deionizzata e 1,1  $\mu$ l/ml di PMA 0.2 mM. I campioni sono stati messi a incubare per 1 h a 37° C e al 5% di CO<sub>2</sub>. Al termine del periodo di incubazione, sono stati effettuati 3 lavaggi con 5 ml di Balance Salt Solution (BSS) contenente NaCl 137 mM, KCl 5 Mm, MgSO<sub>4</sub> 0.8 Mm, HEPES 10Mm, pH finale a 7.4 (conservata a 4°C). Al termine dell'ultimo lavaggio, il pellet è stato risospeso in 1 ml di soluzione di lisi contenete DMSO (Dimetilsolfossido) 90% (v/v), SDS (Sodiododecilsolfato) 0.1% (w/v) ed NaOH 0.01 N, avendo cura di dissolvere bene il pellet. Infine, i campioni sono stati centrifugati a 4000 rpm per 6 minuti ed è stata letta l'assorbanza allo spettrofotometro a 715 nm (Varian).

#### ***2.7.1.2 Analisi al microscopio ottico***

Aliquote da 50  $\mu$ l della sospensione cellulare sono state prelevate da ciascun campione al termine del periodo di incubazione con l'NBT e contati al microscopio ottico mediante una camera di Burker. Le cellule non differenziate si

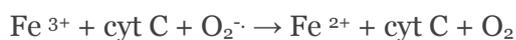
presenteranno di colore giallo, mentre quelle differenziate saranno di colore blu per la presenza dei cristalli di formazano precipitati al loro interno. La percentuale di cellule differenziate è stata quindi calcolata dividendo il numero di cellule che si colorano di blu per il numero totale di cellule (colorate e non) e moltiplicando tale rapporto per 100.

### **2.7.2. Test della Di-Cloro-Fluoresceina Di-Acetato (DCF-DA)**

La DCF-DA è una molecola non polare che diffonde facilmente all'interno delle cellule e viene idrolizzata dalle esterasi intracellulari che rimuovono i gruppi acetato, rendendola polare e quindi impermeabile alla membrana plasmatica. Il nuovo composto polare formatosi, viene ossidato a livello intracellulare dai ROS prodotti in seguito all'attivazione della NADPH ossidasi, formando un prodotto altamente fluorescente, la DCF, che emette alla lunghezza d'onda di 532 nm (268, 269).  $1 \times 10^6$  cellule sono state prelevate da ogni campione e centrifugate a 1300 rpm per 6 minuti, risospese in 5 ml di PBS e divise in due tubi da 15 ml mettendo 2.5 ml di campione per ogni tubo. I campioni sono stati poi centrifugati a 1300 rpm per 6 minuti e risospesi in 200  $\mu$ l di PBS contenente DCF 10  $\mu$ M con e senza PMA 0.2mM. Dopo avere incubato per 2 h a 37 °C e al 5% di CO<sub>2</sub> sono stati aggiunti 800  $\mu$ l di PBS e si è proceduto alla lettura al citofluorimetro (FACScan)

### **2.7.3. Test dei Superossidi**

Questo metodo si basa sulla misurazione spettrofotometrica della riduzione del citocromo C, aggiunto al mezzo di incubazione, da parte dei radicali superossido generati in seguito all'attivazione della NADPH ossidasi, secondo la seguente reazione:



Il passaggio del citocromo dallo stato ossidato a quello ridotto comporta un aumento dell'assorbanza a 550 nm che è proporzionale alla quantità di citocromo ridotto.

0.5 x10<sup>6</sup> cellule sono state prelevate da ogni campione, centrifugate a 1300 rpm per 6 minuti e il pellet è stato risospeso in 200 µl di HBSS contenente Citocromo C (100mg/ml) e in presenza o meno di PMA. I campioni sono stati quindi incubati a 37°C e in presenza del 5% di CO<sub>2</sub> per 1 h. Al termine del periodo di incubazione, i campioni sono stati centrifugati a 1700 rpm per 6 minuti e sui surnatanti è stata letta l'assorbanza a 550 nm allo spettrofotometro (Varian).

#### ***2.7.4. Valutazione dell'espressione dell'antigene di superficie CD11b***

Come indice dell'avvenuto differenziamento, è stata valutata l'espressione dell'antigene di superficie CD11b, caratteristico delle cellule che si sono differenziate verso al linea granulocitaria (271). Per l'analisi dell'espressione dell'antigene di superficie, 2x 10<sup>6</sup> cellule sono state prelevate da ogni campione, centrifugate a 1300 rpm per 6 minuti, risospese in 5 ml di PBS contenente BSA (Albumina Sierica Bovina) 1% e sodio azide 0.1%, centrifugate nuovamente a 1300 rpm per 6 minuti e risospese in 200 µl di PBS contenente BSA 1% e sodio azide 0.1%. Questi 200 µl sono stati divisi in aliquote da 100µl ciascuna a cui sono stati poi aggiunti 10 µl di PBS e 10µl di CD11b rispettivamente. Per ogni campione è stato inoltre preparato il corrispondente controllo isotipico. I campioni sono stati incubati per 30 minuti a temperatura ambiente e al buio. Al termine del periodo di incubazione sono stati aggiunti 2 ml di PBS contenente BSA 1% e sodio azide 0.1% e i campioni sono stati centrifugati a 1300 rpm per 6 minuti, risospesi in 1 ml di paraformaldeide (PFA) al 2% in PBS e letti al citofluorimetro.

### **2.7.5. Valutazione del differenziamento delle cellule di eritroleucemia K562 mediante il Test della Benzidina**

Al fine di valutare se le capacità anti-proliferative e differenzianti del pinoresinolo erano specifiche nei confronti delle cellule HL60, abbiamo testato gli effetti di questo composto anche sulle cellule di eritroleucemia K562.  $0.5 \times 10^5$  cellule totali sono state incubate in presenza di concentrazioni crescenti di Pinoresinolo (1, 10 e  $100\mu\text{M}$ ) e con due induttori positivi del differenziamento in senso eritrocitario, il NaB e l'Ara-C. La proliferazione cellulare è stata determinata con il test di esclusione del Trypan Blue. Le cellule K562 sono in grado di differenziare verso la linea eritrocitaria se sottoposte ad opportuni stimoli, da parte ad esempio del NaB e dell'Ara-C. Il differenziamento ad eritrociti si traduce nella capacità di produrre emoglobina la cui presenza viene rilevata dalla colorazione con il test della benzidina (272). Per la valutazione dell'effetto differenziante,  $0.5 \times 10^6$  cellule sono state prelevate dalla sospensione cellulare, centrifugate e risospese in  $100\mu\text{l}$  di PBS a cui sono stati aggiunti  $50\mu\text{l}$  di una soluzione allo 0.2% di benzidina in acido acetico (HAc) 0.5M e  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 3%. Dopo un periodo di incubazione di 5 minuti al buio e a temperatura ambiente e le cellule positive al test, che presentano un colorazione blu, sono state contate al microscopio.

## **2.8. Western Blotting**

### **2.8.1. Estrazione delle proteine**

Il tampone di estrazione per le proteine contiene:

-Tris-HCl 50 mM, pH 6.8

-SDS 2%

-Blu di Bromofenolo 0.1%

-Glicerolo 10%

-DTT (Di-Tio-Treitolo) 100 mM, preparato alla concentrazione di 1M in sodio acetato 0,01M, pH 5,2 e stoccato alla temperatura di  $-20^{\circ}\text{C}$ , aggiunto al momento dell'uso

-Cocktail di inibitori per le proteasi, aggiunto al momento dell'uso

Per  $12 \times 10^6$  cellule occorrono 200  $\mu\text{l}$  di tampone. Gli opportuni volumi di sospensione cellulare, prelevati da ciascun campione, sono stati lavati due volte con 15 ml di PBS e centrifugati a 1500 rpm per 10 minuti. Al termine dei lavaggi, a ciascun campione sono stati aggiunti il tampone di estrazione, il DTT (50 $\mu\text{l}$ /ml di tampone) e il cocktail di inibitori delle proteasi (50 $\mu\text{l}$ /mL di tampone). I campioni sono stati tenuti in ghiaccio e quindi sonicati per 20" per due volte. Al termine della sonicazione, i campioni sono stati messi a riscaldare a bagnomaria a  $100^{\circ}\text{C}$  per 5 minuti e quindi congelati a  $-20^{\circ}\text{C}$  sino al momento dell'uso.

### **2.8.2 Elettroforesi**

Il running gel è stato preparato all'8% di acrilamide/bis-acrilamide in miscela con  $\text{H}_2\text{O}$  di TRIS 1.5 M, SDS al 10% e con i catalizzatori APS al 10% e TEMED. Lo

stacking gel al 5% di Acrilamide/Bis-Acrilamide è stato preparato in miscela con H<sub>2</sub>O deionizzata, TRIS 1M, SDS 10%, APS al 10% e TEMED. Il trasferimento delle proteine dal gel alla membrana di nitrocellulosa è stato effettuato overnight 30V e a 4°C. Al termine del trasferimento le membrane sono state colorate con il rosso ponceau, lavate con TBS (TRIS base, NaCl, H<sub>2</sub>O, pH finale 7,6) incubate con il blocking buffer (TBS, latte in polvere 5%, TWEEN 20 0,1%, da preparare in agitazione) per 1 h. Al termine dell'incubazione sono stati effettuati 3 lavaggi con TBS\T (TBS, TWEEN 20 0,1%) ed è stato aggiunto il blocking buffer contenente l'anticorpo primario. Le membrane sono state incubate a 4° C per tutta la notte in oscillazione. Al termine dell'incubazione con il primario, sono stati effettuati tre lavaggi con TBS\T ed è stato aggiunto il blocking buffer contenente l'anticorpo secondario. Le membrane sono state quindi incubate per 1 h in oscillazione a temperatura ambiente. Trascorsa l'ora di incubazione, le membrane sono state lavate con TBS\T per 3 volte e quindi sviluppate su lastra fotografica in camera oscura.

## ***2.9 Valutazione del trascritto genico mediante RT-PCR***

1 x 10<sup>6</sup> cellule sono state prelevate da ciascun campione, centrifugate a 1300rpm per 6 minuti e risospese in 1 ml di reagente TRIZOL e lasciate per 5 min a 15-30°C. Dopo aver aggiunto 0.2 ml di cloroformio/ml di TRIZOL, i campioni sono stati miscelati per 15 secondi e quindi incubati a 15-30°C per 2-3 minuti. Successivamente si centrifugano i campioni a 11.310 rpm per 10 minuti a 2-8°C. Dopo la centrifugata si otterranno due fasi, l' RNA si trova in quella acquosa superiore, mentre DNA e proteine si trovano in quella organica sottostante. Il recupero della fase acquosa corrisponde al 60% circa del volume di TRIZOL inizialmente utilizzato. Dopo aver trasferito la fase acquosa in un'altra provetta si

aggiungono 0.5 ml di alcool isopropilico/ml di TRIZOL. Incubare 10 minuti a 15-30°C e centrifugare a 11310 rpm per 10 minuti a 2-8°C. Il pellet viene quindi risospeso in 1 ml di etanolo al 75% mantenuto a -20°C e centrifugato a 8940 rpm per 5 minuti a 2-8°C. al termine della centrifuga, il pellet viene fatto seccare per 5-10 minuti e infine risospeso in H<sub>2</sub>O RNAsi free o SDS 0.5%. Una volta isolato l'RNA da ciascun campione, si determina la sua purezza valutando la densità ottica a 260 nm e a 280 nm. La lettura allo spettrofotometro viene effettuata diluendo i campioni in tampone TRIS/EDTA. Il rapporto tra la D.O a 260 nm e a 280 nm deve essere compreso tra 1.8 e 2.0 affinché il campione di RNA sia considerato puro. Successivamente si calcolano i µg/µl di RNA presenti in ciascun campione mediante la seguente formula:

$$\mu\text{g}/\mu\text{l} = \text{D.O. } 260\text{nm} \times 40 \times \text{fattore di diluizione}/1000$$

Da ogni campione vengono quindi prelevati gli opportuni µl contenenti una quantità di RNA pari a 5 µg. Dopo essere stato digerito con la DNase I (Invitrogen S.R.L.), secondo la procedura specificata dal produttore, l'RNA verrà quindi convertito in cDNA, usando SuperScript II Rnase, H- Reverse Transcriptase, deossiribonucleosidi trifosfato 1 mmol/l and 250 ng di random primers (Invitrogen). A 2µl di cDNA così ottenuto, verranno quindi aggiunti 2 U di Platinum Taq DNA polymerase, deossiribonucleosidi trifosfato 2 mmol/l e i primers senso e antisenso 1 µmol/l. La sequenza dei primers utilizzati è la seguente:

p21 senso: 5'-TTAGGGCTTCCTCTTGGAGAAGAT-3'

p21 antisenso: 5'-ATGTCAGAAC CGGCTGGGGATGTC-3';

p27 senso: 5'-CCTCTTCGGCCCGGTGGAC-3'

p27 antisenso: 5'-TTTGGGGAACCGTCTGAAAC-3';

$\beta$ -actina senso: 5'-AACAGAGGCATCCTCACCT-3'

$\beta$ -actina antisenso 5'-TACATGGCTGGGGTGTGAA-3'.

Il programma utilizzato per la PCR prevede le seguenti condizioni:

45 s a 94°C per la denaturazione, 45 s a 60°C ( $\beta$ -actina) e 55°C (p21, p27) per l'annealing, 1 min a 72°C per la polimerizzazione.

Il numero totale di cicli è compreso tra 32 e 38. Il prodotto della PCR è stato quindi analizzato mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1.8% e visualizzato mediante marcatura con bromuro di etidio.

### ***2.10. Analisi dei dati***

I dati ottenuti i sono riportati come la media  $\pm$  SD e sono il risultato di test eseguiti in triplicato per ogni condizione sperimentale. La significatività statistica dei dati è stata calcolata, ove necessario, mediante il test "t" di Student per dati non appaiati e mediante il test ANOVA (analysis of variance) ad una via. Solo quei valori di  $p < 0.05$  sono stati considerati statisticamente significativi. Quando  $p < 0.05$ , le medie dei valori sono state confrontate con il test di Tukey e con il test di Dunnett.

Composti fenolici	VOO-PE (cultivar)			
	Ogliarola	Coratina	Nocellara	Taggiasca
3,4-DHPEA	3.2±0.3 (0.10) <sup>1</sup>	9.9±1.0 (0.32)	25.4±2.3 (0.82)	52.0±4.7 (1.69)
p-HPEA	15.3± 1.3 (0.55)	4.4±0.4 (0.16)	30.1±2.5 (1.09)	69.8±5.8 (2.53)
3,4-DHPEA-EDA	300.3±28.6 (4.70)	485.0±40.5 (7.58)	280.5±26.7 (4.38)	133.9±12.8 (2.09)
p-HPEA-EDA (Oleocantale)	111.8± 10.3 (1.84)	128.0±12.8 (2.11)	65.6±6.1 (1.08)	39.5±3.7 (0.65)
3,4-DHPEA-EA (Oleuropeina aglicone)	207.4± 19.0 (2.7)	112.6±11.3 (1.49)	128.1±11.7 (1.69)	145.3±11.5 (1.92)
(+)-1-acetossipinoresinolo	21.3± 1.8 (0.26)	23.2±2.3 (0.28)	42.9±3.6 (0.51)	64.4±7.6 (0.77)
(+)-pinoresinolo	12.0±0.9 (0.17)	17.7±1.8 (0.25)	34.1±2.6 (0.48)	96.7±2.5 (1.35)
Verbascoside	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Fenoli totali	606±7.9 (10.06)	780.9±10.0 (12.18)	671.3±8.9 (10.36)	601.6±6.9 (11.00)

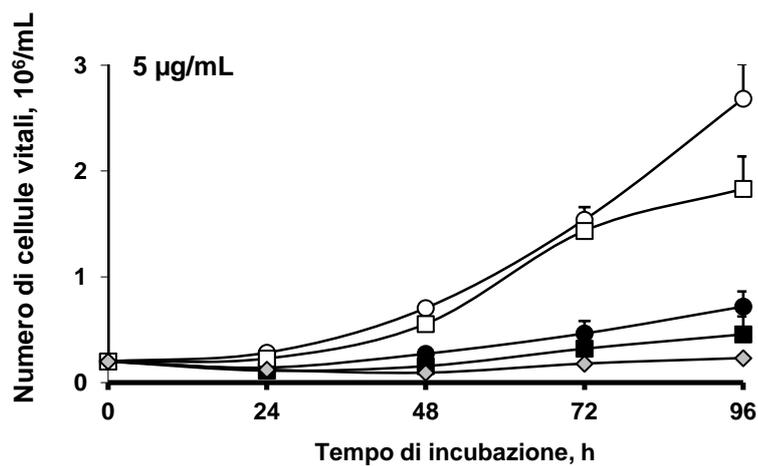
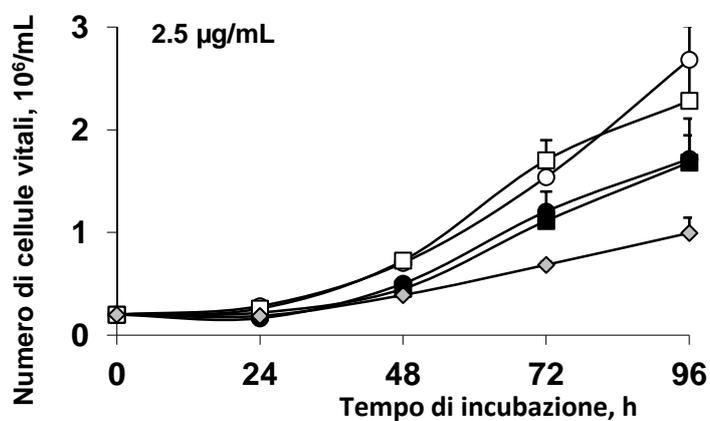
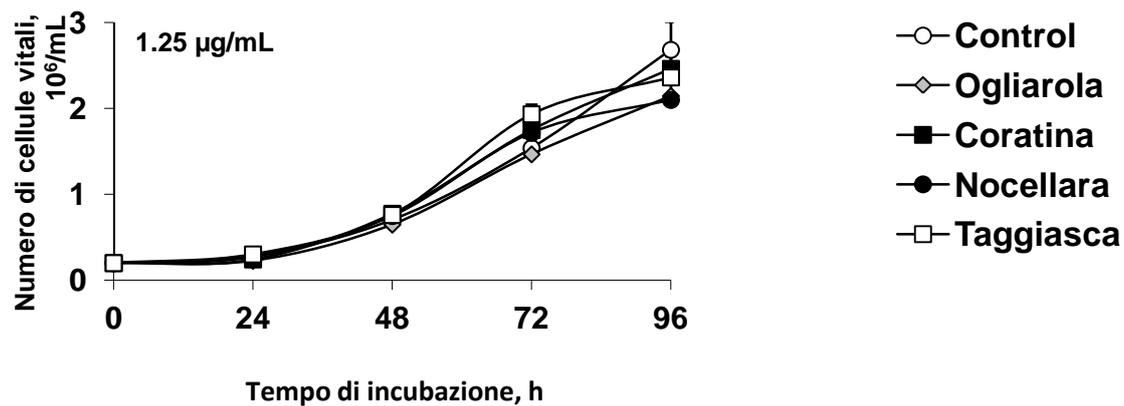
**Tabella 1.** Composizione fenolica degli estratti ottenuti da oli extravergini di oliva (VOO-PE) di differenti cultivar (mg/g di estratto) degli estratti con una concentrazione totale di fenoli corrispondente a 5µg/ml. <sup>1</sup> Tra parentesi sono riportate le concentrazioni micromolari dei differenti composti fenolici in seguito alla solubilizzazione nel terreno di coltura (RPMI 1640). <sup>2</sup>N.D.: not detected

### **3. RISULTATI**

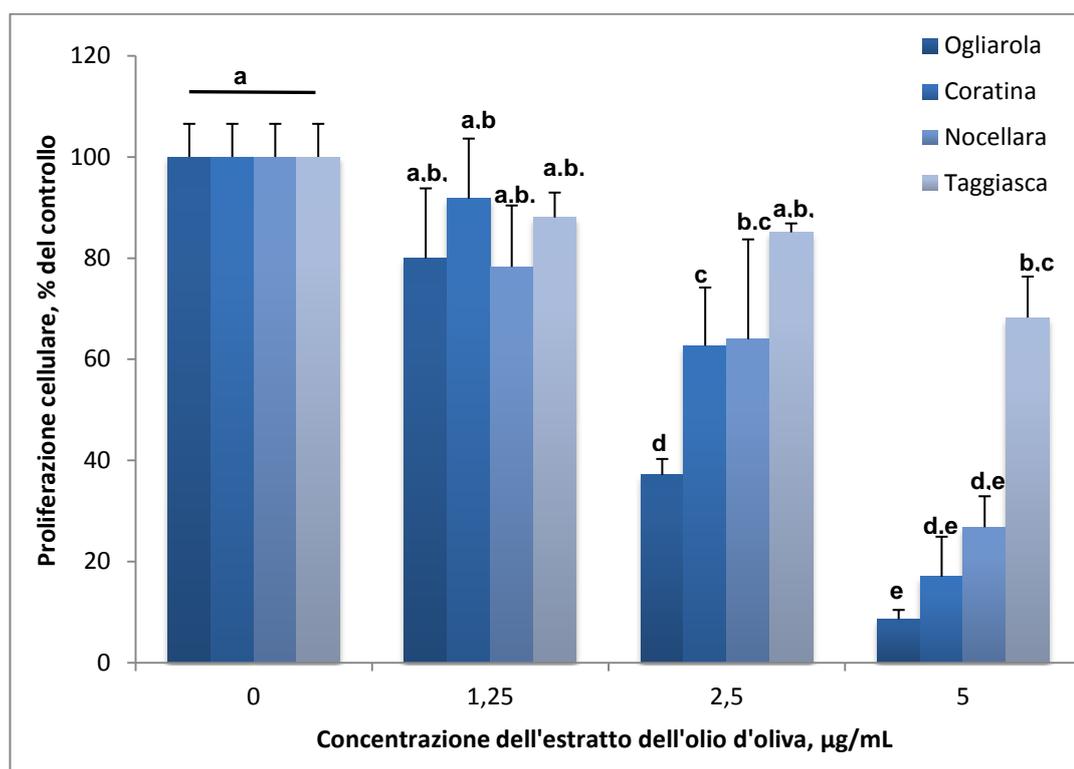
#### ***3.1. Effetti degli estratti fenolici sulla proliferazione e sul ciclo cellulare delle HL60***

I dati relativi alla proliferazione cellulare delle HL60 trattate con dosi crescenti (1.25, 2.5 e 5 $\mu$ M) dei quattro Estratti Fenolici per 24, 48, 72 e 96 ore sono riportati in Figura 1 e 2. I risultati ottenuti indicano che il trattamento con la dose più bassa degli estratti (1.25 $\mu$ g/ml) non è stato in grado di esercitare un effetto antiproliferativo. Alla dose di 2.5 $\mu$ g/ml e dopo 72 ore di trattamento, l'estratto di Ogliarola è risultato essere il più efficace nell'inibire la proliferazione cellulare seguito da quello di Coratina. Alla dose massima del trattamento (5 $\mu$ M), gli estratti di Ogliarola, Coratina e Nocellara hanno mostrato un effetto antiproliferativo significativo già dopo 48 ore di trattamento, mentre per l'estratto di Taggiasca è stato notato un effetto piccolo, ma significativo, solo dopo 96 ore di trattamento. Le concentrazioni in grado di ridurre la proliferazione del 50% (IC<sub>50</sub>) sono state rispettivamente 2.02  $\mu$ g/mL per l'estratto di Ogliarola, 3.18  $\mu$ g/mL per quello di Coratina,; 3.46  $\mu$ g/mL per quello di Nocellara e >5.00  $\mu$ g/mL per quello di Taggiasca.

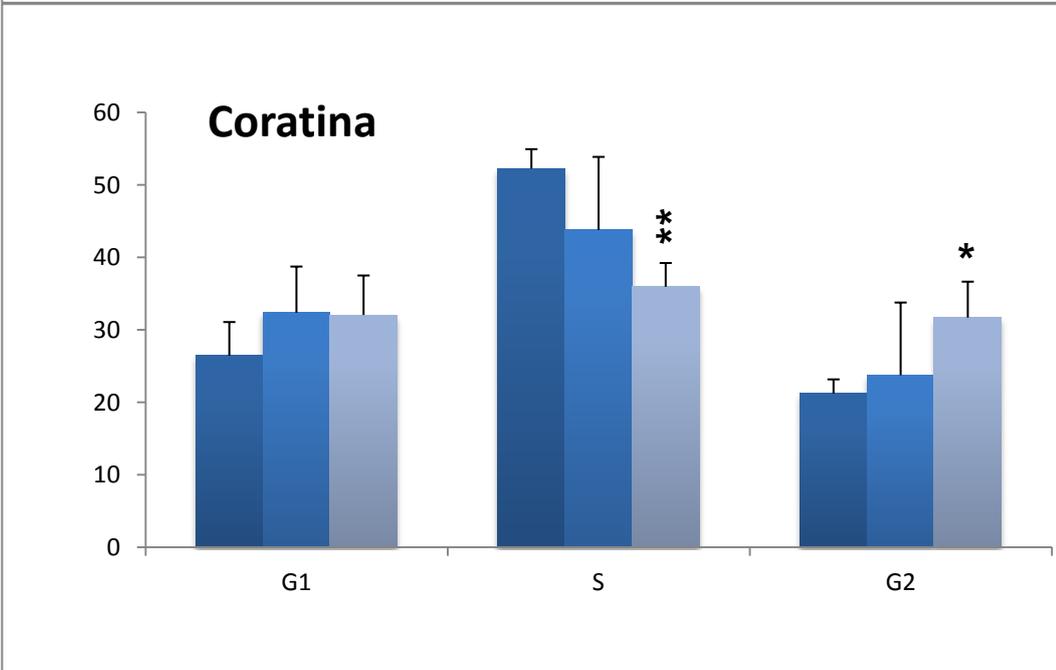
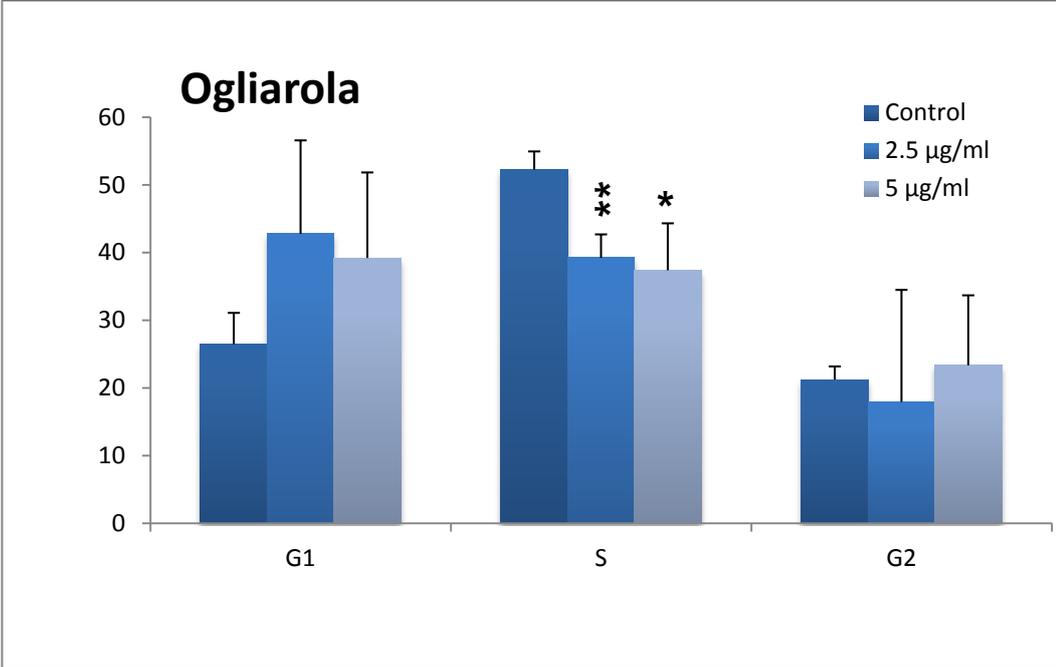
I dati relativi all'effetto degli estratti sulla distribuzione delle cellule nelle varie fasi del ciclo cellulare sono riportati in Figura 3. Dopo 24 ore di trattamento con la massima concentrazione degli estratti di Ogliarola, Coratina e Nocellara, (5 $\mu$ g/ml), si nota una riduzione significativa delle cellule in fase S; il trattamento con gli estratti di Coratina e Nocellara ha inoltre prodotto un aumento delle cellule in fase G<sub>2</sub>/M. Nessun effetto significativo è stato invece riscontrato nelle cellule trattate con l'estratto di Taggiasca.

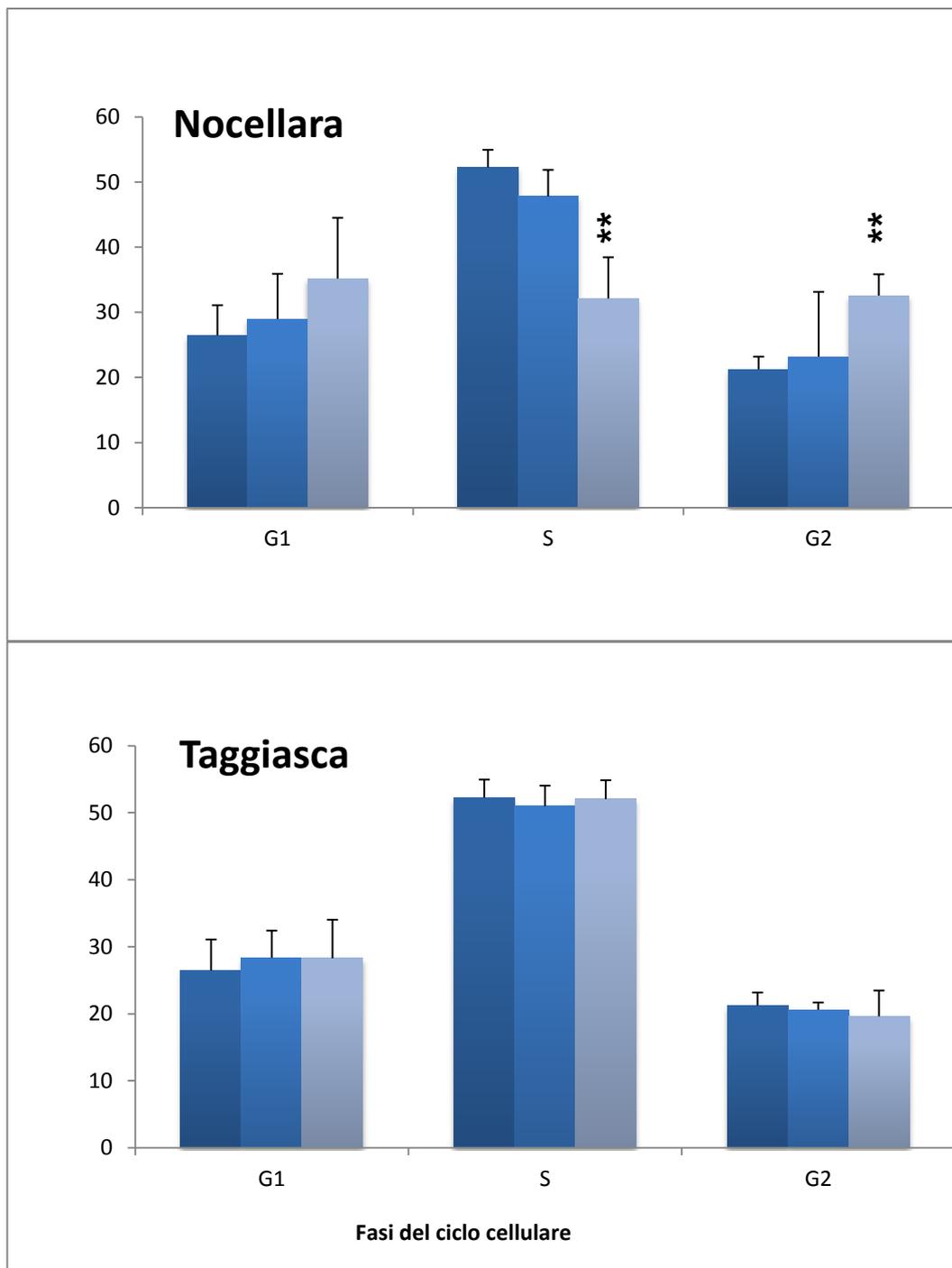


**Figura 1.** Effetto degli Estratti Fenolici di Ogliarola, Coratina, Nocellara e Taggiasca alle concentrazioni di 1.25, 2.5 e 5µg/ml sulla proliferazione delle cellule HL60. I dati riportati sono la media di 5 esperimenti indipendenti  $\pm$  DS.



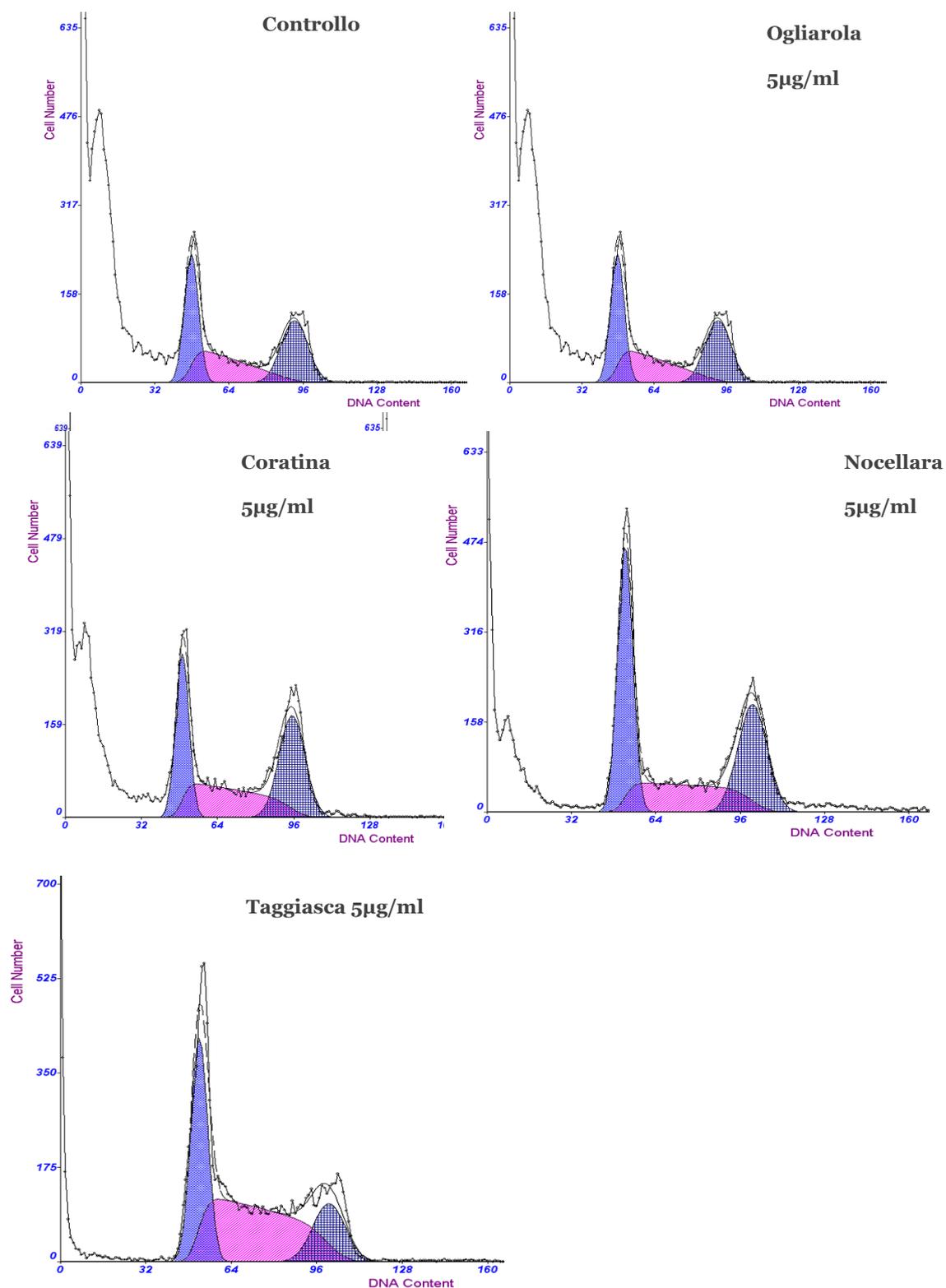
**Figura 2.** Effetto della concentrazione crescente degli estratti sulla proliferazione delle cellula HL60 dopo 96 ore di trattamento valutato con il test dell'MTT. I dati ottenuti sono la media di 5 esperimenti indipendenti  $\pm$  DS. Le medie con lettere diverse differiscono per  $p < 0.05$ .





**Figura 3.** Effetto degli estratti fenolici di Ogliarola, Coratina, Nocellara e Taggiasca, sulla distribuzione delle cellule HL60 nelle varie fasi del ciclo cellulare. I dati riportati sono la media di 3 esperimenti indipendenti  $\pm$ DS.

\*  $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$  rispetto al controllo.

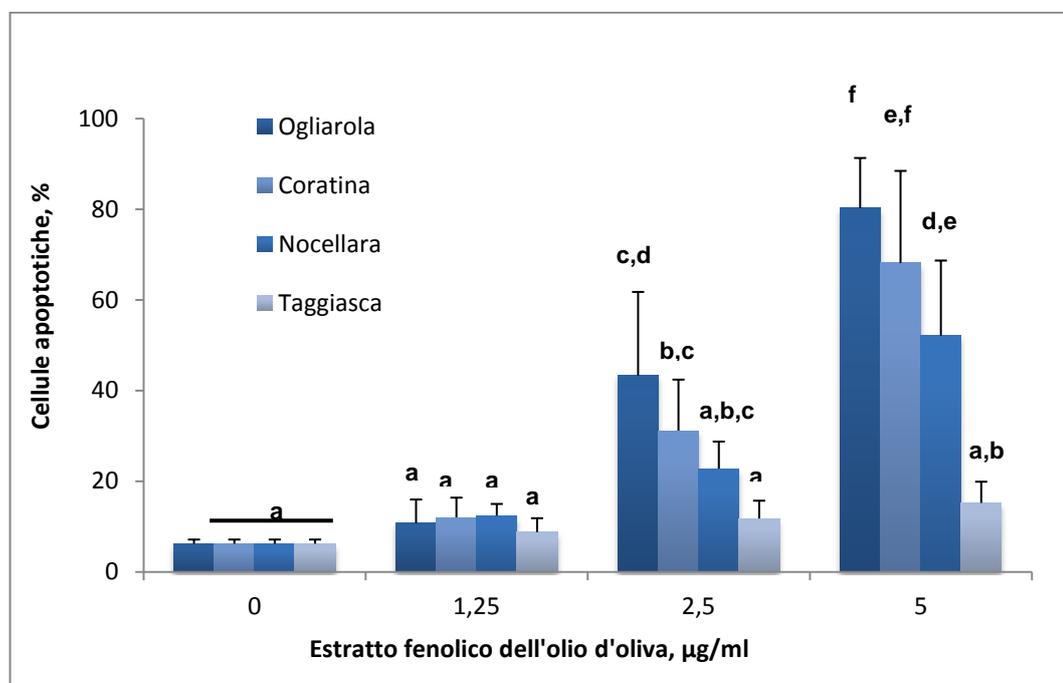


**Figura 4.** Effetto degli estratti fenolici di Ogliarola, Coratina, Nocellara e Taggiasca alla dose di 5µg/ml sul ciclo cellulare delle cellule HL60 dopo 24 ore di trattamento. Gli istogrammi di citometria a flusso sono rappresentativi di un esperimento (n=3).

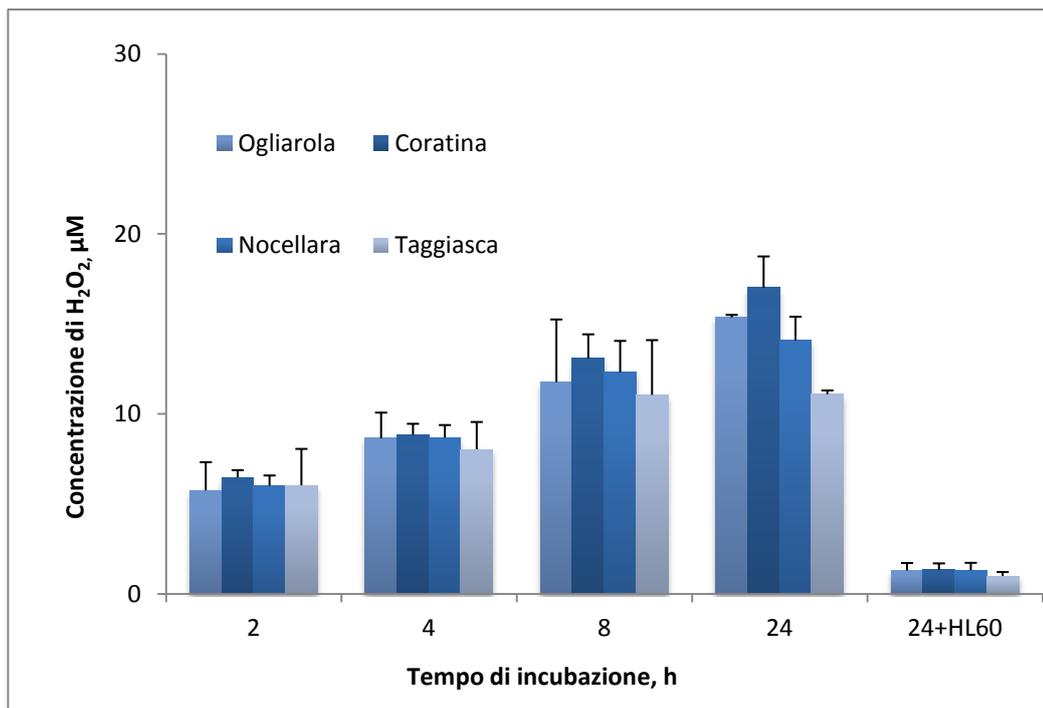
### ***3.2. Effetto del trattamento con gli estratti sull'apoptosi delle cellule HL60***

I dati relativi all'induzione dell'apoptosi da parte degli estratti sulle cellule HL60 sono riportati nelle figure 5, 6 e 7. I dati ottenuti indicano che alla dose più bassa (2.5µg/ml) non è stato osservato nessun effetto significativo sull'apoptosi dopo 24 ore di trattamento per tutti e quattro gli estratti. Di contro, il trattamento con la dose intermedia (2.5µg/ml) ha mostrato un effetto significativo per gli estratti di Ogliarola e di Coratina ma non per quelli di Nocellara e Taggiasca. Alla dose più alta (5µg/ml), gli estratti di Ogliarola, Coratina e Nocellara sono stati in grado di esercitare un effetto proapoptotico significativo, a differenza di quanto osservato per l'estratto di Taggiasca, che, anche alla dose più elevata, non è stato in grado di indurre un effetto proapoptotico significativo rispetto al controllo. Considerato che l'effetto proapoptotico di alcuni componenti degli estratti, come dimostrato nel corso di studi precedenti, è mediato dall'accumulo di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nel terreno di coltura, siamo andati a valutare la concentrazione dell' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in presenza della massima concentrazione degli estratti, dopo 2, 4, 8 e 24 ore di incubazione. I dati ottenuti indicano che, in assenza di FCS e di cellule, tutti e quattro gli estratti sono stati in grado di determinare accumulo di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nel terreno di coltura che è risultato inoltre essere tempo dipendente; tuttavia, la concentrazione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> si è ridotta notevolmente in presenza delle cellule poichè esse dispongono di enzimi antiossidanti che sono in grado di detossificarlo efficacemente. Per valutare se l'effetto proapoptotico degli estratti era dovuto all'aumento della concentrazione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nei terreni di coltura, abbiamo incubato le cellule in presenza ed in assenza di CAT (100U/ml). Dopo 24 ore di trattamento, con la dose massima degli estratti, la percentuale di cellule apoptotiche, in presenza ed in assenza di CAT, è rimasta pressoché uguale, indicando che l'induzione del processo

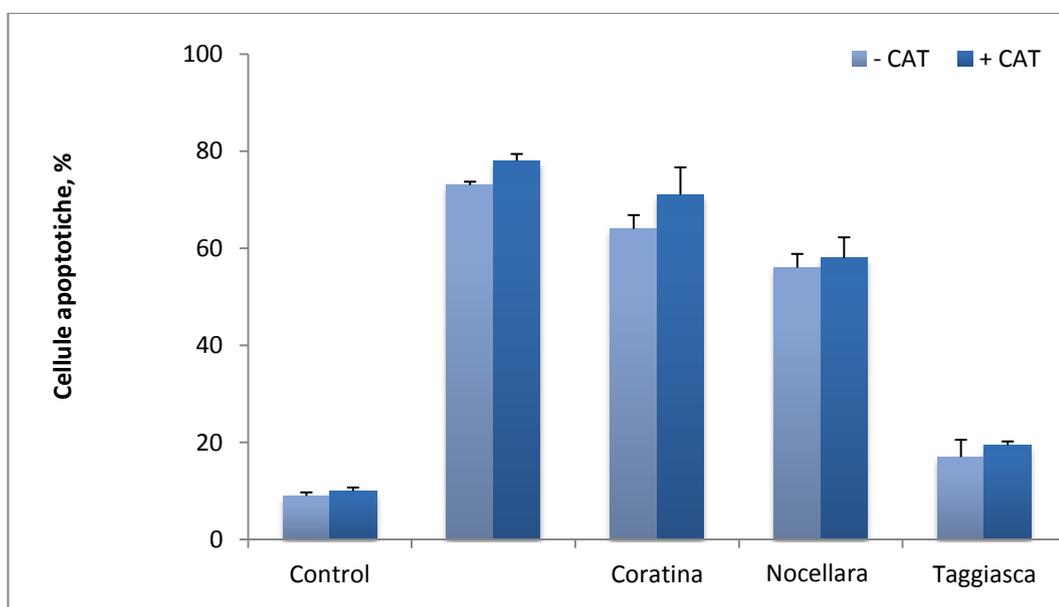
apoptotico non è mediato dall'aumento della concentrazione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nel terreno di coltura.



**Fig. 5.** Effetto proapoptotico degli estratti di Ogliarola, Coratina, Nocellara e Taggiasca (1.25, 2.5 e 5µg/ml) sulle cellule HL60 dopo 24 ore di trattamento. I dati riportati sono la media di 5 esperimenti indipendenti ±DS. Le medie con lettere diverse differiscono per  $p < 0.05$ .



**Fig.6** Effetto tempo dipendente degli estratti di Ogliarola, Coratina, Nocellara e Taggiasca (5µg/ml) sull'accumulo di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nel terreno di coltura in assenza di FCS e di cellule (primi quattro set di diagrammi) e in presenza di cellule (ultimo set di diagrammi). I dati ottenuti sono la media di 5 esperimenti indipendenti ±DS..



**Fig. 7.** Effetto degli estratti di Ogliarola, Coratina, Nocellara e Taggiasca (5µg/ml) sull'apoptosi delle cellule HL60 in presenza ed in assenza di catalasi (100U/ml). I dati riportati sono la media di 5 esperimenti indipendenti ± DS.

### ***3.3 Analisi della correlazione tra la composizione fenolica e gli effetti chemio preventivi degli estratti***

Nel tentativo di identificare la relazione tra la composizione degli estratti fenolici e la loro diversa capacità di inibire la proliferazione e indurre l'apoptosi, il potenziale chemiopreventivo degli estratti è stato correlato alla quantità dei diversi fenoli in essi presenti. L'analisi delle correlazioni è stata effettuata usando le concentrazioni molari dei composti nel terreno di coltura e la loro attività antiproliferativa (espressa come percentuale della inibizione della crescita cellulare dopo 72 ore di trattamento con la dose massima di estratto, 5µg/ml) e proapoptotica (espressa come percentuale di cellula apoptotiche dopo 24 ore di trattamento sempre con la dose massima).

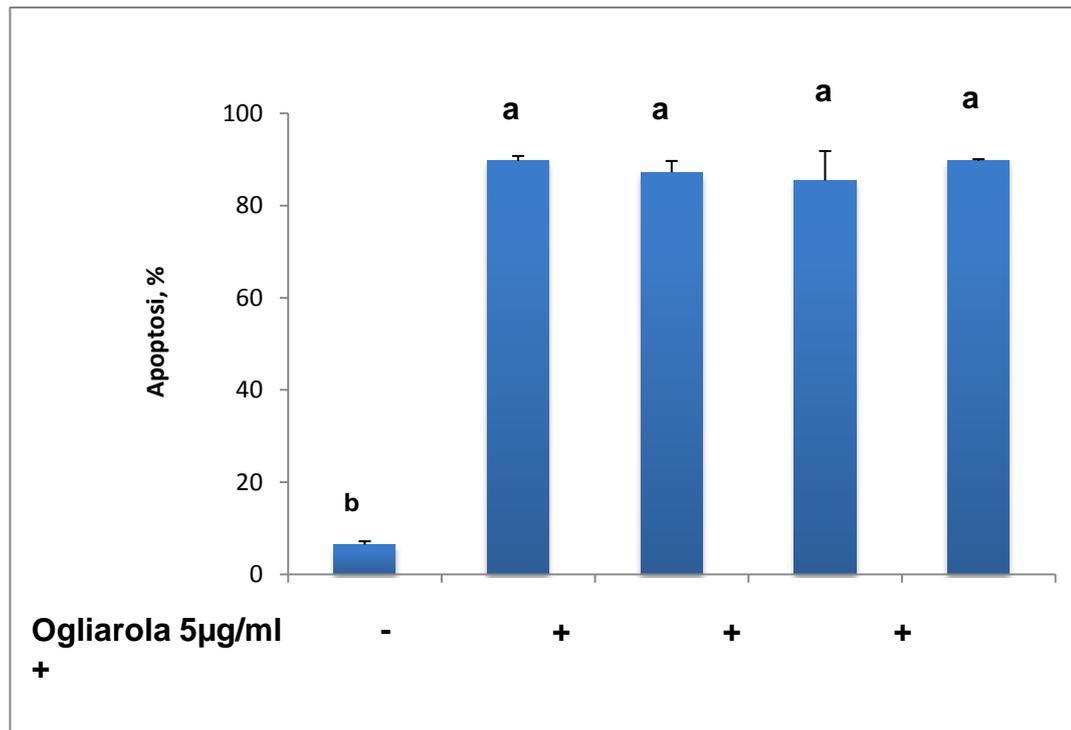
L'analisi delle correlazioni (Tabella 2) ha mostrato che le attività antiproliferativa e proapoptotica degli estratti sono altamente correlate l'una all'altra e non sono correlate alla concentrazione totale dei fenoli presenti negli estratti; l'effetto antiproliferativo e proapoptotico sono negativamente correlati alla concentrazione degli alcoli fenolici (idrossitirosolo e tirosolo) e dei lignani (pinoresinolo ed acetosipinoresinolo) e positivamente correlate alla concentrazione dei derivati EDA, sia dell'idrossitirosolo che del tirosolo; l'effetto proapoptotico è inoltre debolmente correlato alla concentrazione dell'acido elenoico dell'idrossitirosolo. L'esistenza, del tutto inaspettata, della correlazione negativa tra la concentrazione dei lignani e gli effetti chemiopreventivi, ci ha portati a pensare che questo composto potesse comportarsi da modulatore negativo del processo apoptotico. Per verificare questa ipotesi abbiamo incubato le cellule HL60 in presenza dell'estratto che ha mostrato il maggiore effetto proapoptotico (Ogliarola) e di concentrazioni crescenti di pinoresinolo (1, 5, 10µM). I dati ottenuti hanno mostrato che la presenza del pinoresinolo non altera la capacità da parte

dell'estratto di indurre l'apoptosi nella popolazione cellulare in studio. I dati ottenuti sono riportati in figura 8.

	<b>Apoptosi, %</b>	<b>Inibizione della proliferazione, %</b>
<b>Apoptosi, %</b>	1.000	
<b>Inibizione della proliferazione, %</b>	0.991**	1.000
<b>3,4-DHPEA</b>	-0.998**	-0.986*
<b>p-HPEA</b>	-0.945	-0.957*
<b>3,4-DHPEA-EDA</b>	0.746	0.765
<b>p-HPEA-EDA</b>	0.898	0.869
<b>3,4-DHPEA-EA</b>	0.338	0.254
<b>(+)-1-acetoxypinoresinol</b>	-0.983*	-0.966*
<b>(+)-pinoresinol</b>	-0.983*	-0.998**
<b>Total phenols</b>	-0.085	-0.087

**Tabella 2.** Calcolo del coefficiente di Pearson tra le concentrazioni dei diversi composti fenolici negli estratti e i loro effetti antiproliferativi e proapoptici sulle HL60.

\* P<0.05; \*\* P<0.01



**Fig.8** Effetto proapoptotico dell'estratto di Oglarola (5µg/ml) in presenza ed in assenza di concentrazioni crescenti di pinoresinolo (1, 5 e 10µM) sulle HL60 dopo 24 di trattamento. I dati ottenuti sono la media di tre esperimenti indipendenti ±DS. Le medie con lettere diverse differiscono per  $p < 0.05$ .

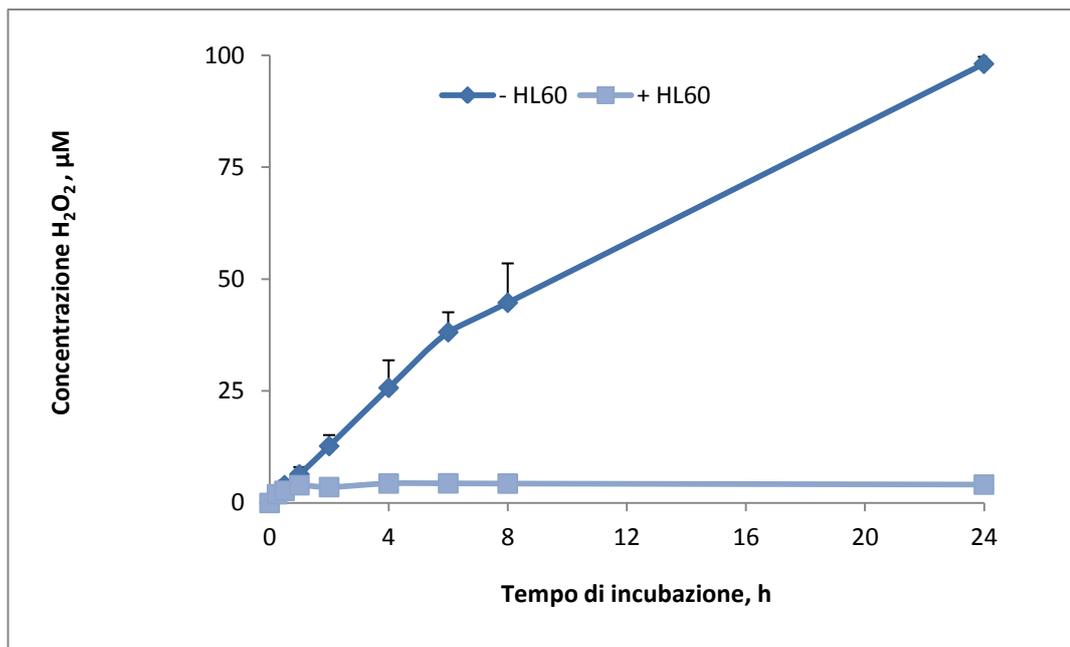
### ***3.4. Produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> da parte dell'Idrossitirosolo e induzione dell'apoptosi***

I dati relativi all'accumulo di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nel terreno di coltura in presenza di Idrossitirosolo (100µM) sono riportati in figura 9 e 10. I risultati ottenuti mostrano che l'aumento della concentrazione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nel terreno di coltura completo (RPMI + FCS) in presenza di idrossitirosolo 100µM, risulta essere sia tempo che dose dipendente ed è influenzata dalla presenza delle cellule e dall'aggiunta di FCS. Infatti, in presenza delle cellule HL60 (0,2 x 10<sup>6</sup>/ml) già dopo la prima ora di trattamento la concentrazione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> si riduce drasticamente, stabilizzandosi intorno a 5 µM per tutta la durata del trattamento

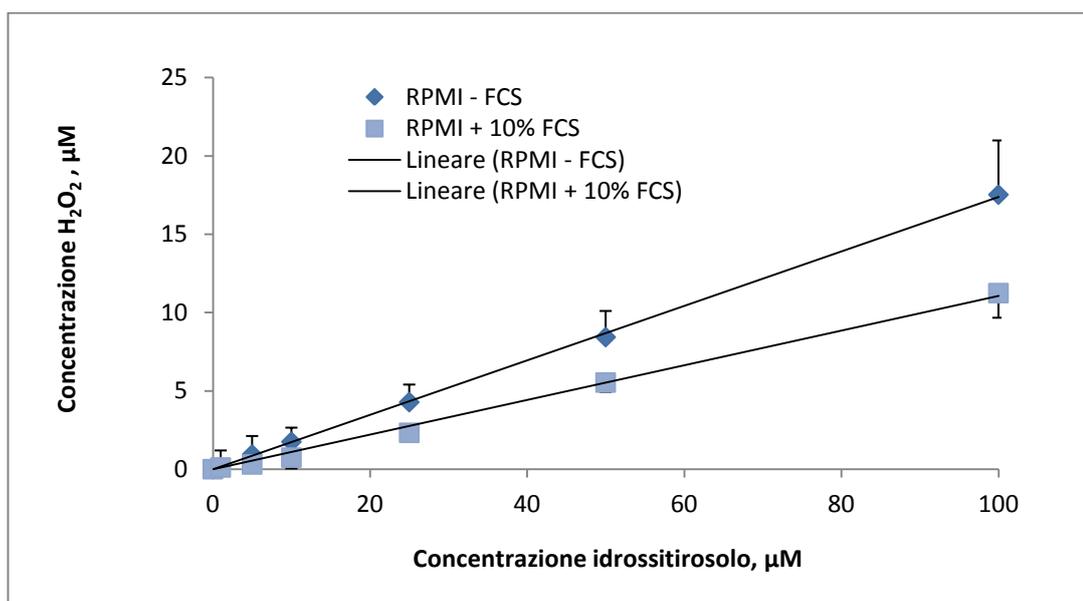
(24h) (Fig. 9); in assenza di cellule e in terreno RPMI1640 formulato con l'aggiunta del 10% di FCS, l'accumulo di  $H_2O_2$ , dopo 24 ore, è ridotto del 35%.

I dati relativi all'effetto proapoptotico dell'idrossitirosole, indotto dall'accumulo di  $H_2O_2$  nei vari terreni di coltura, sono riportati in Figura 11 e 12. I dati ottenuti mostrano che dopo 24 ore di trattamento con idrossitirosole  $100\mu M$ , il 75% circa delle cellule HL60 va incontro ad apoptosi, che viene però ridotta (25%) in seguito all'aggiunta di Catalasi (CAT  $100 U/mL$ ) al terreno di coltura (Fig.13). L'aggiunta della Catalasi riduce inoltre significativamente anche l'accumulo di  $H_2O_2$  (Fig.13). L'aggiunta al terreno di coltura di basse concentrazioni di  $H_2O_2$  ( $2.5-7.5 \mu M$ ), simili a quelle generate in presenza di Idrossitirosole  $100\mu M$ , rende le cellule HL60 molto suscettibili all'apoptosi (Figura 14).

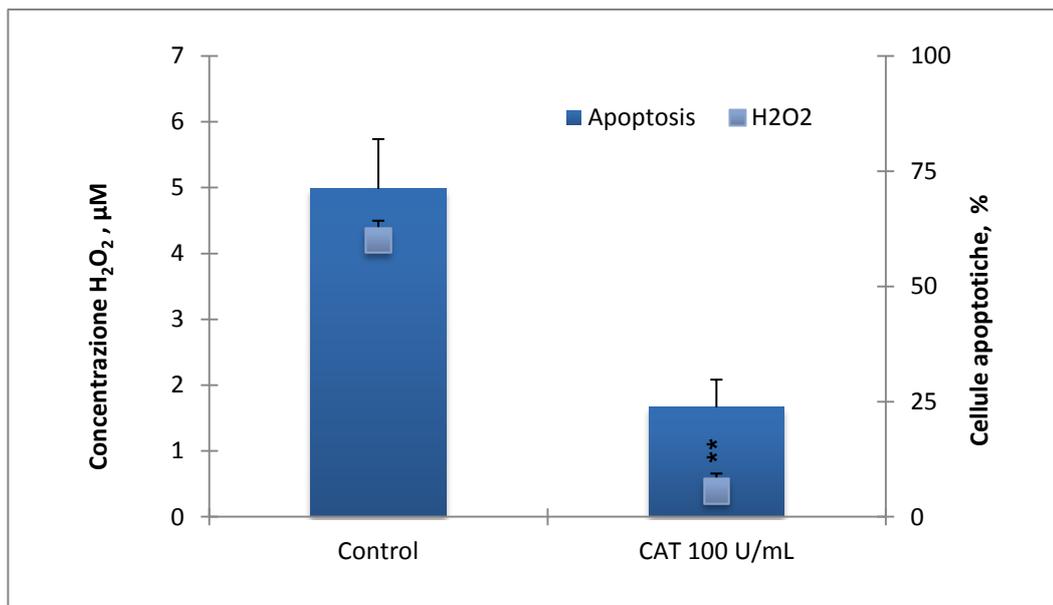
I dati ottenuti indicano che l'idrossitirosole è in grado di determinare l'accumulo di  $H_2O_2$  nel terreno di coltura indipendentemente dalla presenza di siero; la concentrazione di  $H_2O_2$  aumenta all'aumentare del tempo di incubazione e si riduce in presenza delle cellule HL60 già dopo la prima ora di trattamento, mantenendosi costante nell'arco delle 24 ore; l'effetto proapoptotico dell'idrossitirosole è mediato dall'accumulo di  $H_2O_2$  nel terreno di coltura: infatti in presenza di CAT, un enzima in grado di detossificare il  $H_2O_2$ , si osserva la riduzione della percentuale di cellule che va incontro al processo apoptotico. Le condizioni sperimentali relative al tipo di terreno utilizzato per allestire la coltura cellulare, hanno influenzato la capacità di accumulare  $H_2O_2$  in presenza di idrossitirosole  $100\mu M$ ; di conseguenza, in presenza dei diversi terreni, la percentuale di cellule apoptotiche è risultata essere differente.



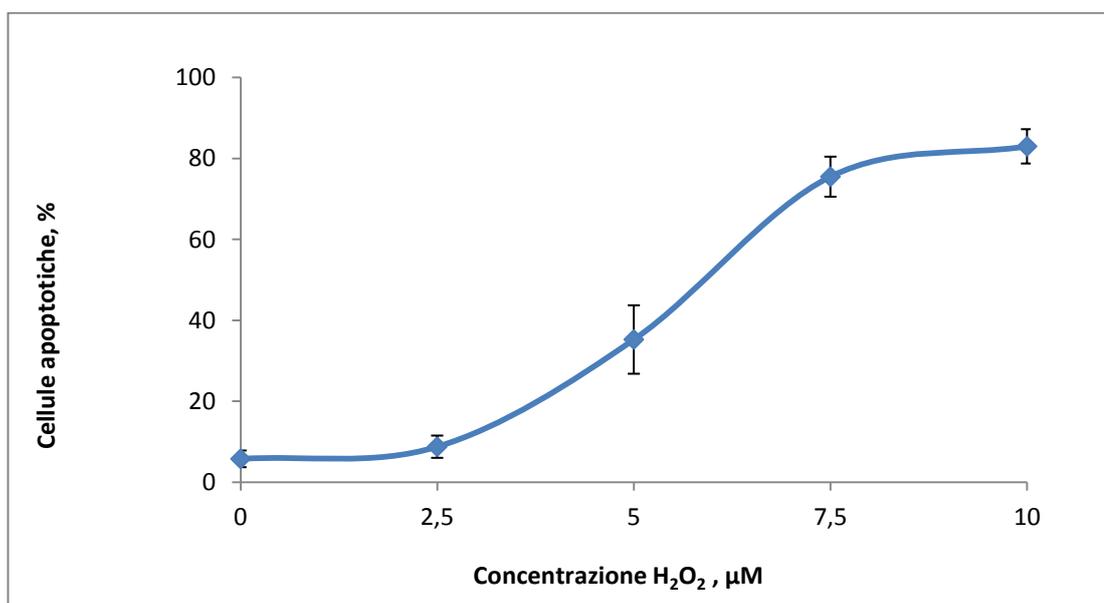
**Fig. 9** Effetto tempo-dipendente dell'idrossitiroso 100μM sull'accumulo di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in RPMI completo, in presenza ed in assenza di cellule di leucemia promielocitica umana HL60. I dati riportati sono la media di tre esperimenti indipendenti ± DS.



**Fig.10** Effetto dose-dipendente dell'idrossitiroso, in assenza di cellule di leucemia promielocitica umana HL60, sull'accumulo di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dopo 3h di incubazione, in RPMI formulato con e senza FCS. I dati riportati sono la media di tre esperimenti indipendenti ± DS.



**Fig. 11** Effetto della Catalasi (CAT) sull'accumulo di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e sull'apoptosi indotte dall'Idrossitiroso 100μM in RPMI completo e in presenza di cellule di leucemia promielocitica umana HL60. I dati riportati sono la media di tre esperimenti indipendenti ± DS. \*\* p<0.01



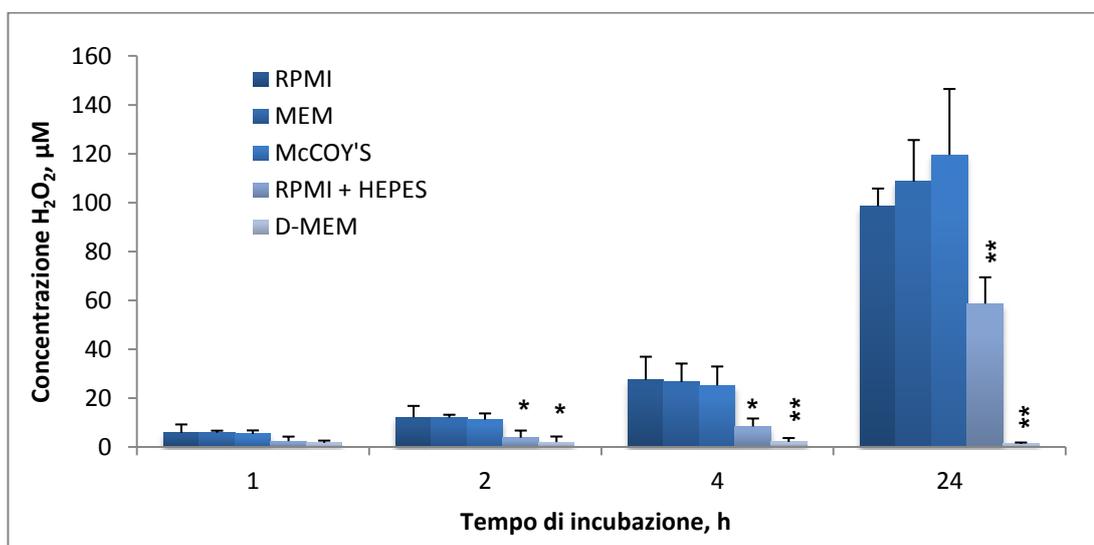
**Fig. 12** Effetto dell'aggiunta di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al terreno di coltura sull'apoptosi di cellule di leucemia promielocitica umana HL60. I dati riportati sono la media di tre esperimenti indipendenti ± DS.

### ***3.5. Effetti dei differenti terreni sulla produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediata dall'idrossitirosolo e apoptosi***

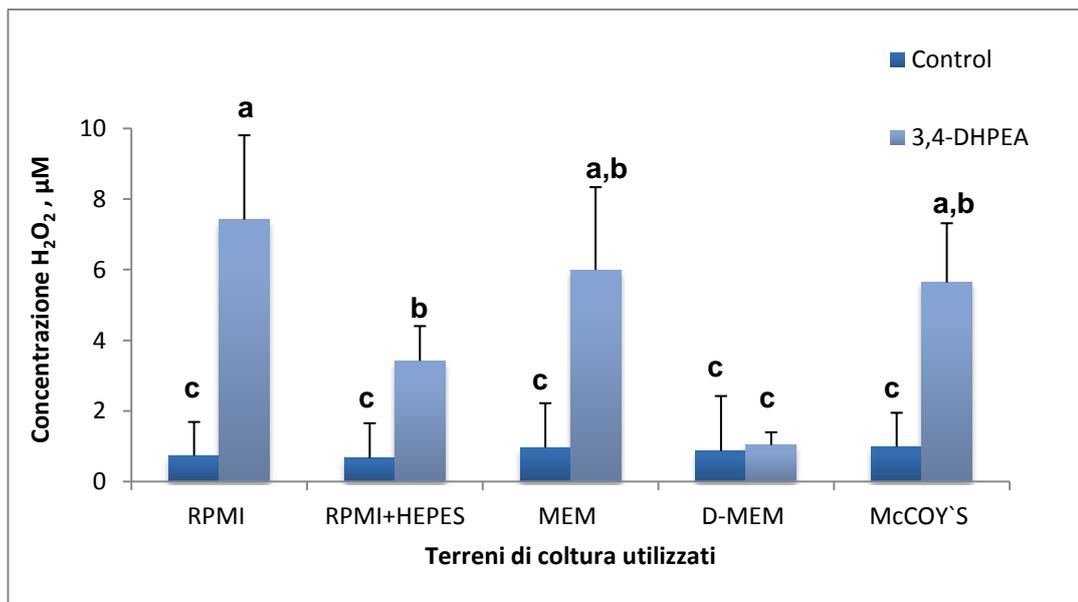
La capacità dell'idrossitirosolo (100 µM) di accumulare H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in differenti terreni di coltura (RPMI, MEM, McCOY'S, RPMI+HEPES e D-MEM), in presenza ed in assenza di cellule, è riportata in figura 13. I dati ottenuti mostrano che in assenza di cellule la velocità di produzione dell'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nei vari terreni risulta essere tempo dipendente e particolarmente elevata in RPMI, MEM e McCOY'S; in questi terreni, inoltre, l'accumulo di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> è confrontabile; l'aggiunta di HEPES (un composto comunemente usato per tamponare il pH) all'RPMI riduce significativamente la concentrazione dell' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> di circa il 50% rispetto a quanto osservato negli altri terreni di coltura, mentre il D-MEM ne previene completamente la formazione. Di conseguenza, l'attività proapoptotica dell'idrossitirosolo nei confronti delle cellule HL60, non era diversa quando esse venivano trattate in RPMI, MEM e McCOY'S, mentre veniva significativamente ridotta quando le cellule erano trattate in presenza RPMI+HEPES e D-MEM (Figura 15).

Per identificare i componenti del terreno di coltura D-MEM responsabili dell'inibizione dell'accumulo di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> la sua composizione chimica è stata confrontata con quella degli altri terreni utilizzati. Il D-MEM è risultato l'unico terreno contenente piruvato (110 mg/L, 1 mM). Per valutare se questo composto fosse responsabile della riduzione della concentrazione dell' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, il piruvato 1 mM è stato aggiunto all'RPMI in assenza ed in presenza di cellule. I dati ottenuti mostrano che, in seguito all'aggiunta di piruvato, l'accumulo di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in presenza di Idrossitirosolo si riduce significativamente (Figura 15) e, di conseguenza, si riduce anche la sua attività proapoptotica (Figura 16).

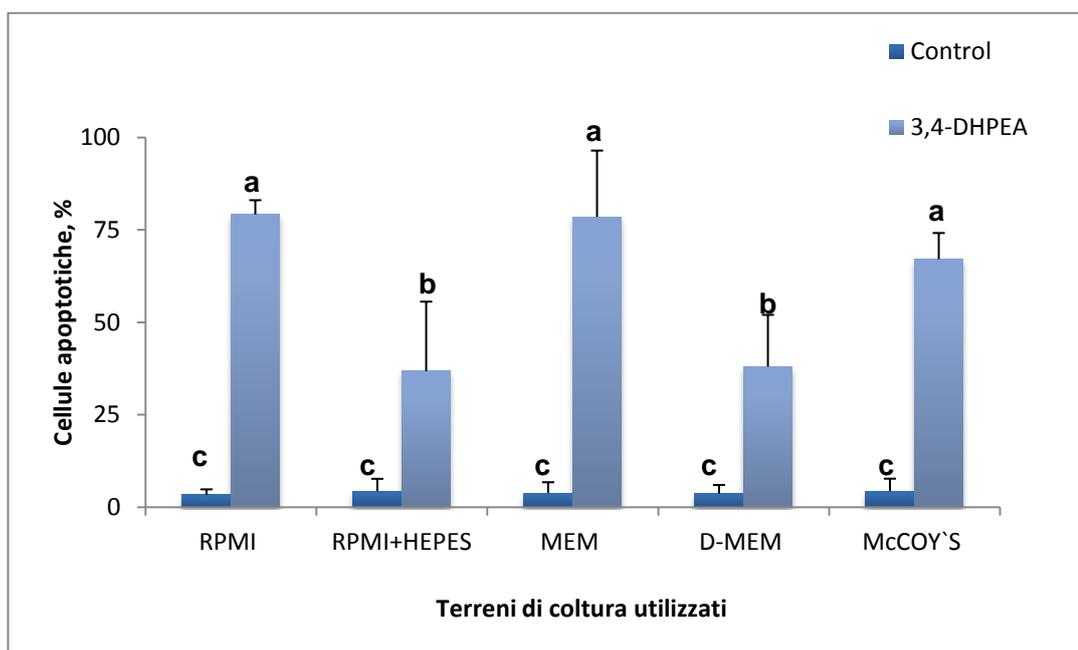
Incubando le cellule in presenza di Idrossitiroso e in condizioni che non sostengono l'accumulo di  $H_2O_2$ , (RPMI + CAT, RPMI + piruvato e D-MEM), l'effetto proapoptotico dell'Idrossitiroso è comunque presente. La percentuale di cellule apoptotiche risulta infatti pari a  $23.8 \pm 6.0$  % in RPMI + CAT,  $27.6 \pm 7.3$  % in RPMI + Piruvato e  $38.0 \pm 14.0$  % in D-MEM. Questi risultati suggeriscono che altri meccanismi sono probabilmente coinvolti nell'innescare del processo apoptotico in aggiunta al rilascio di  $H_2O_2$ , da parte dell'idrossitiroso.



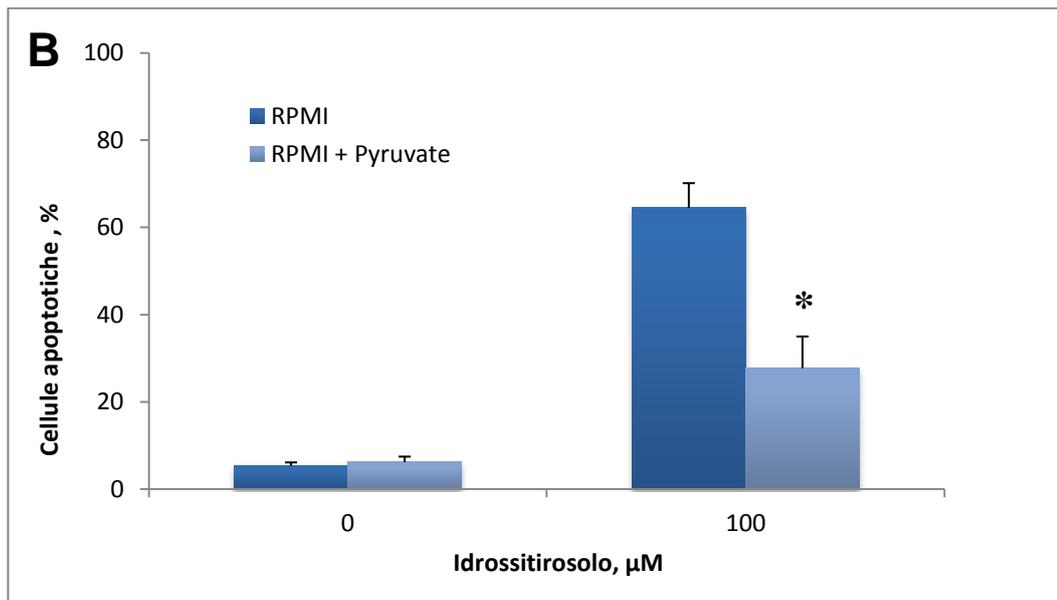
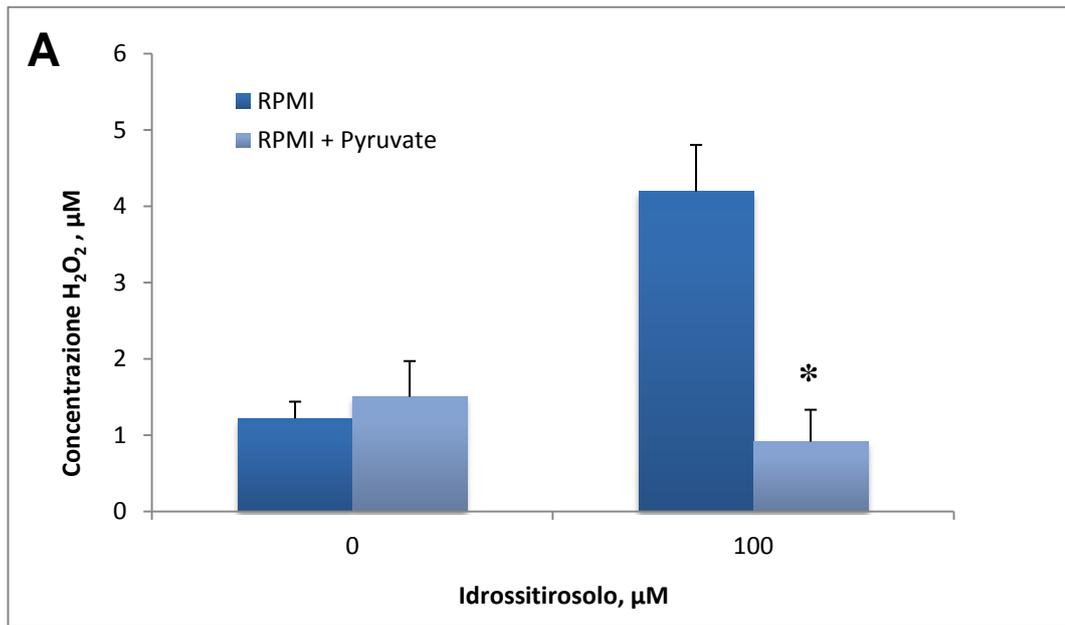
**Fig.13** Effetto tempo-dipendente sull'accumulo di  $H_2O_2$  indotto dall'Idrossitiroso  $100\mu M$  in vari terreni di coltura in assenza di cellule di leucemia promielocitica umana HL60. I dati riportati sono la media di tre esperimenti indipendenti  $\pm$  DS. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$



**Fig.14** Effetto dell'idrossitirosolo 100µM, sull'accumulo di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in vari terreni di coltura dopo 24 h di incubazione in presenza di cellule di leucemia promielocitica umana HL60. I dati riportati sono la media di cinque esperimenti indipendenti ± DS. Le medie con lettere diverse differiscono per p<0.05.



**Fig. 15.** Effetto dell'idrossitirosolo 100µM, sull'apoptosi delle cellule di leucemia promielocitica HL60 in vari terreni di coltura, dopo 24 h di incubazione. I dati ottenuti sono la media di cinque esperimenti indipendenti ± DS. Le medie con lettere diverse differiscono per p< 0.05.



**Fig.16 Pannello A** Effetto del Piruvato 1 mM sull'accumulo di  $\text{H}_2\text{O}_2$  indotto dall'Idrossitiroso  $100\mu\text{M}$  in RPMI in presenza di cellule di leucemia promielocitica umana HL60. **Pannello B.** Effetto del Piruvato 1 mM sull'apoptosi di cellule di leucemia promielocitica umana HL60, indotta dall'Idrossitiroso  $100\mu\text{M}$  dopo 24 h di incubazione. I dati riportati sono la media di cinque esperimenti indipendenti  $\pm$  DS. \* $p < 0.05$ .

### ***3.6. Meccanismi attraverso il quale l'idrossitirosolo induce la formazione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>***

Per determinare se l'attività di rilascio dell' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> era dovuta all'interazione tra l'Idrossitirosolo e alcuni componenti del terreno di coltura, questo è stato incubato in PBS 100 mM (tampone sodio fosfato) a differenti valori di pH (6.8, 7.8) e in differenti condizioni (pH 7.8 +SOD, pH 7.8 +Tyr, pH 7.8 +N<sub>2</sub>) (Tabella 3). La concentrazione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> è stata quindi determinata a vari tempi: 1, 2, 4 e 24 ore. I dati ottenuti indicano che l'idrossitirosolo è in grado di indurre la formazione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS a pH 7.8 ma non a pH 6.8. Inoltre, la presenza della superossido dismutasi, (SOD 100 U/ml), un enzima in grado di catalizzare la dismutazione del superossido con produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>, migliora l'accumulo di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indotto dall'Idrossitirosolo mentre l'aggiunta della tirosinasi (TYR 1 µg/ml), che attraverso la sua attività difenolasica catalizza l'ossidazione dell'Idrossitirosolo con formazione del corrispondente o-chinone, previene completamente la formazione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In modo analogo, quando la reazione è fatta avvenire in presenza di N<sub>2</sub> e in assenza di O<sub>2</sub> (PBS pH 7.8 che è stato saturato con N<sub>2</sub> per 1 h sia prima che dopo l'aggiunta di idrossitirosolo), la produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> viene completamente inibita. Quest'ultimo dato risultato suggerisce che l' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> è il prodotto della riduzione dell' O<sub>2</sub>. Infine, l'aggiunta di diversi metalli di transizione (*o*-fenantrolina, deferoxamina, batocuproina e neocuproina) alla concentrazione di 100 µM in PBS at pH 7,8 non modifica la produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indotta dall'idrossitirosolo (dati non mostrati).

Condizioni sperimentali	Tempo di incubazione (h)			
	1	2	4	24
pH 6.8	2.4 ± 0.6 <sup>d</sup>	2.5 ± 0.3 <sup>d</sup>	2.7 ± 0.8 <sup>d</sup>	1.5 ± 0.5 <sup>d</sup>
pH 7.8	3.3 ± 0.4 <sup>d</sup>	7.2 ± 1.1 <sup>d</sup>	11.4 ± 1.4 <sup>c,d</sup>	23.1 ± 3.7 <sup>b,c</sup>
pH 7.8 + SOD	25.9 ± 7.9 <sup>b</sup>	39.6 ± 7.7 <sup>a</sup>	46.1 ± 5.1 <sup>a</sup>	47.5 ± 9.9 <sup>a</sup>
pH 7.8 + TYR	0.5 ± 0.3 <sup>d</sup>	0.9 ± 0.7 <sup>d</sup>	1.6 ± 0.7 <sup>d</sup>	5.2 ± 0.6 <sup>d</sup>
pH 7.8 + N <sub>2</sub>	N.D.	N.D.	N.D.	2.2 ± 1.2 <sup>d</sup>

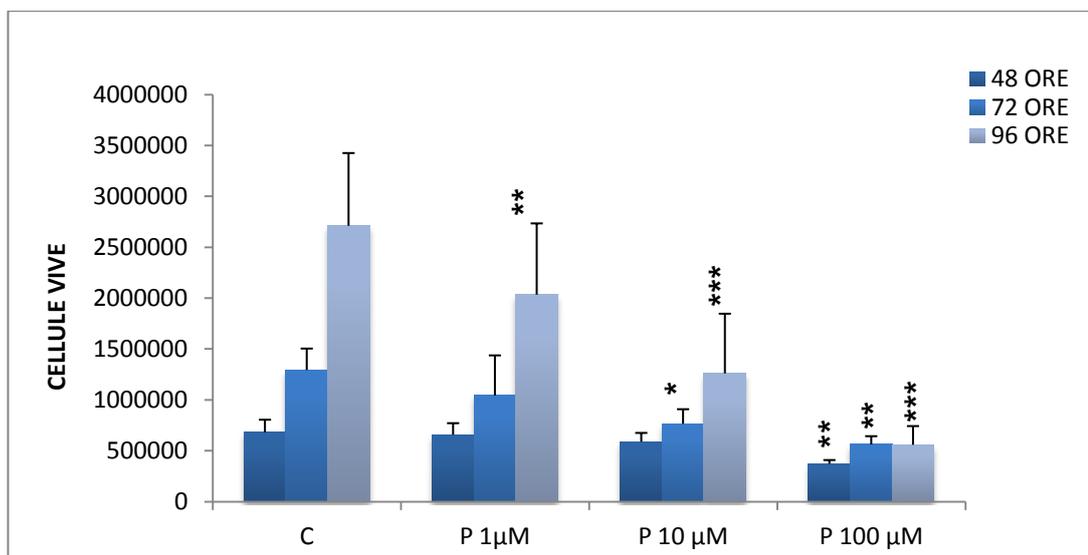
**Tabella 3.** Accumulo tempo-dipendente di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (μM) indotto dall'idrossitirosolo in PBS in presenza di diverse condizioni sperimentali. I dati riportati sono la media di cinque esperimenti indipendenti ± DS. Le medie con lettere diverse differiscono per p<0.05.

### ***3.7. Effetto antiproliferativo, proapoptotico e differenziante del pinoresinolo***

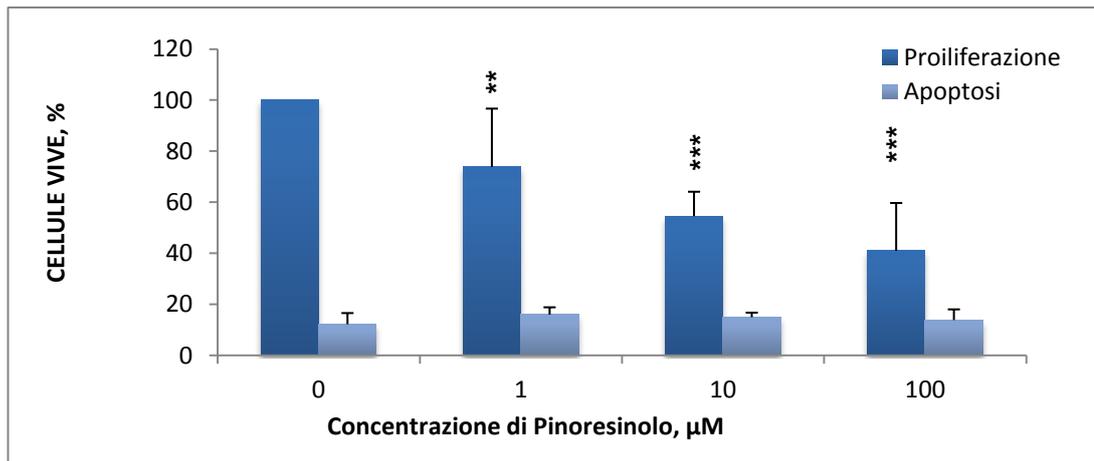
#### ***3.7.1. Effetto antiproliferativo sulle cellule HL60***

L'effetto del Pinoresinolo sulla proliferazione delle cellule HL60 e HL60R è mostrato nelle Figure 17 e 18. Le cellule HL60 e HL60R sono state trattate rispettivamente per 48, 72 e 96 e per 96 ore con concentrazioni crescenti di pinoresinolo (1, 10, 100 μM) e successivamente sono state contate in seguito a colorazione con il Trypan Blue. I dati ottenuti indicano che l'effetto del Pinoresinolo sulla proliferazione delle HL60 risulta essere sia dose che tempo dipendente; dopo 48 ore di trattamento la crescita cellulare non subisce variazioni significative a nessuna delle tre dosi utilizzate; dopo 72 ore di trattamento si osserva una variazione significativa solo alla dose massima di pinoresinolo (100μM); l'effetto sull'inibizione della proliferazione dopo 96 ore di trattamento risulta essere significativo a tutte e tre le dosi utilizzate (1, 10, 100

$\mu\text{M}$ ) in entrambe le linee cellulari. L'inibizione della crescita cellulare dopo 96 ore di trattamento con la dose massima di pinosresinolo ( $100\mu\text{M}$ ) risulta essere pari al 78% e al 59% rispettivamente nelle HL60 e nelle HL60R. L'effetto antiproliferativo del pinosresinolo sulle linee cellulari tumorali in adesione (HCT116, SW480, MCF-7, MDA-MB231, LNCap, PC3) è riportato in tabella 4. I dati ottenuti mostrano che nel caso delle cellule derivate dal colon e dalla prostata, il pinosresinolo esercita un significativo effetto antiproliferativo solo in quelle che hanno p53 funzionante a differenza di quanto osservato per le cellule di cancro al seno in cui l'effetto è stato significativo in quelle con p53 mutata e delle cellule di leucemia HL60, HL60R e K562 le quali hanno p53 nulla.



**Fig. 17** Effetto del pinosresinolo (P) 1, 10,  $100\mu\text{M}$  sulla proliferazione di cellule di leucemia promielocitica HL60. I dati ottenuti sono le medie di tre esperimenti indipendenti  $\pm$  DS. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .



**Fig. 18** Effetto del Pinoresinolo 1, 10, 100 $\mu\text{M}$  sulla proliferazione di cellule di leucemia promielocitica HL60R. I dati ottenuti sono le media di tre esperimenti indipendenti  $\pm$  DS. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

	Linee cellulari	p53 status	Crescita cellulare, % del controllo	p-values rispetto al controllo
<b>Colon</b>	HCT116	Wild type	72±7	0.020
	SW480	Mutata*	102±3	0,2313
<b>Prostata</b>	LNCaP (androgen-dependent)	Wild type	55±9	0.001
	PC3 (androgen-independent)	Mutata	110±25	0,2951
<b>Seno</b>	MCF-7 (estrogen-dependent)	Wild type	96±7	0,2917
	MDA-MB-231 (estrogen-independent)	Mutata	70±6	0.012
<b>Leucemia</b>	HL60	Nulla	21±10	0.005
	K562	Nulla	63±5	0.013
	HL60R	Nulla	41±18	0.001

**Tabella 4** Effetti del trattamento per 96 ore con pinoresinolo 100µM sulla proliferazione di linee cellulari tumorali che esprimono p53 funzionante, mutata o nulla. I dati ottenuti sono la media di 5 esperimenti indipendenti.

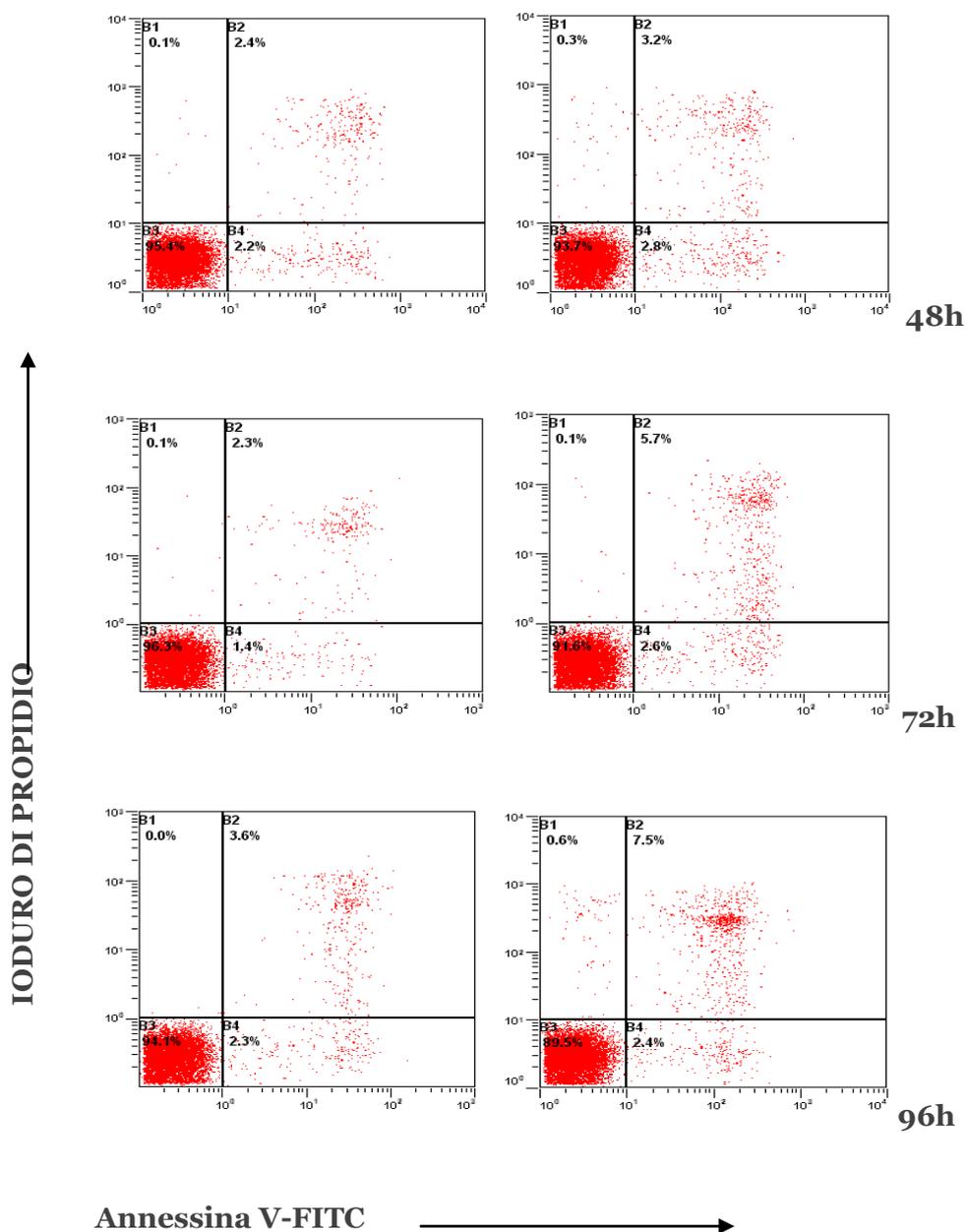
### ***3.7.2. Effetti del pinoresinolo sull'apoptosi e sul ciclo cellulare***

L'effetto proapoptotico del pinoresinolo sulle cellule HL60e è stato valutato mediante citometria a flusso, analizzando la frammentazione del DNA (analisi del picco SubG1, Figura 19) e l'esternalizzazione della fosfatidil serina (saggio

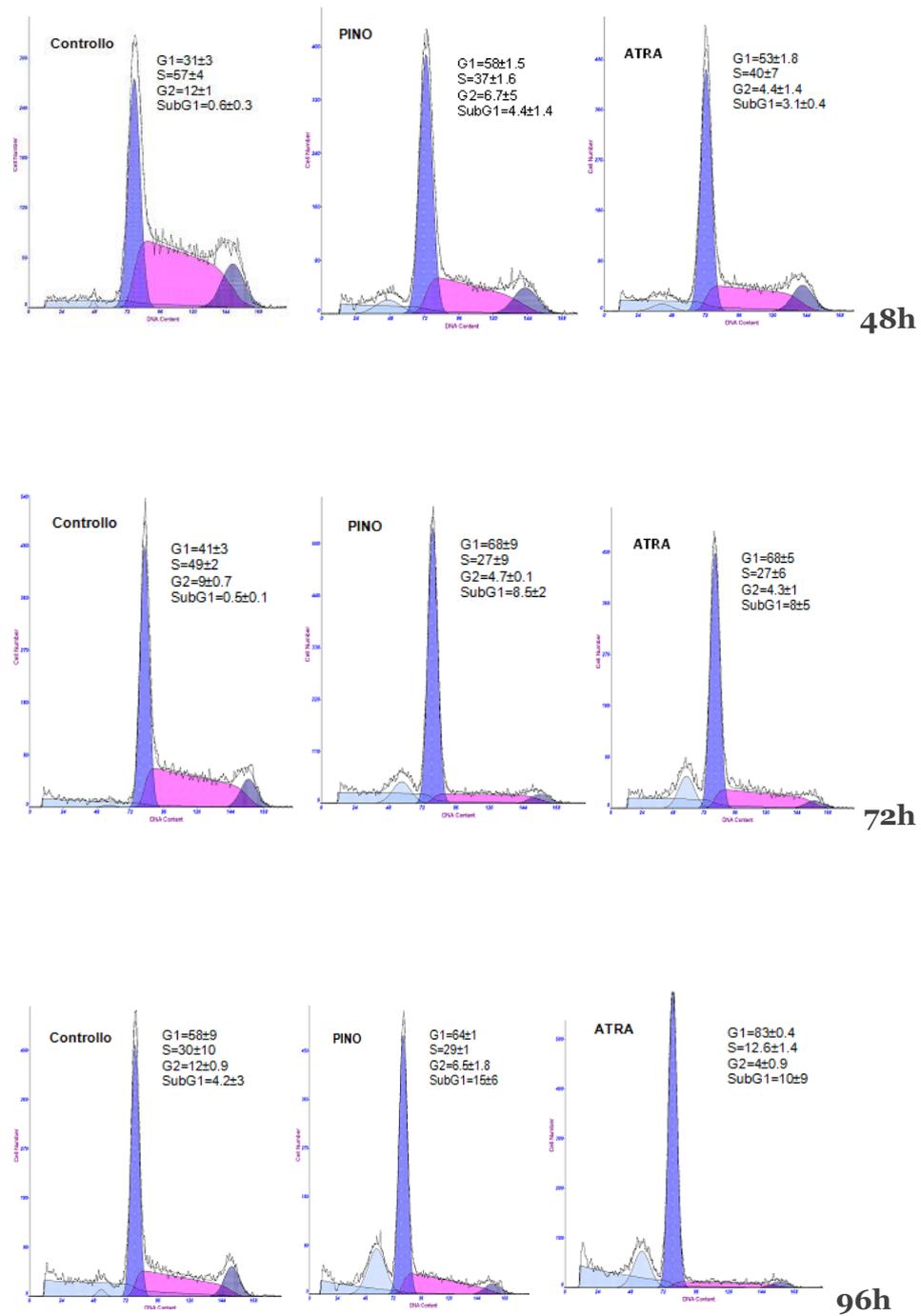
dell'Annexina V-FITC, Figura 20). I risultati ottenuti mediante le due metodiche sono qualitativamente e quantitativamente comparabili e mostrano che l'effetto citostatico, osservato trattando le cellule in presenza di dosi crescenti di pinoresinolo (1, 10, 100 $\mu$ M), non è associato ad un corrispondente effetto citotossico: infatti, la percentuale di cellule che va incontro ad apoptosi in seguito al trattamento per 96 ore con la dose massima di pinoresinolo (100 $\mu$ M), è molto bassa ed è pari al 15%, se valutata con il metodo del SubG1 e all'11%, se valutata con il metodo dell'Annexina V-FITC.

I dati relativi al ciclo cellulare sono riportati in figura 20. Al fine di valutare la distribuzione delle cellule nelle tre fasi del ciclo ( $G_0/G_1$ , S,  $G_2/M$ ), le cellule sono state trattate per 48, 72 e 96 ore in presenza di pinoresinolo 100 $\mu$ M e ATRA 1 $\mu$ M. Si nota che, a tutti e tre i tempi di esposizione, il trattamento sia con pinoresinolo che con ATRA, comporta un aumento della percentuale di cellule che si trovano in fase  $G_0/G_1$  e una diminuzione di quelle in fase S. Infatti, dopo 48 ore di esposizione, la percentuale di cellule in fase  $G_0/G_1$  passa dal 31% nel controllo, al 58% e 53% in quelle trattate rispettivamente con pinoresinolo e ATRA; di contro, la percentuale di cellule in fase S si riduce dal 57% nel controllo al 37% e 40% in quelle trattate con pinoresinolo e ATRA. Dopo 96 ore di trattamento la percentuale di cellule in fase  $G_0/G_1$  passa dal 58% nel controllo al 64% e 83% nelle cellule trattate con pinoresinolo e ATRA; la popolazione cellulare in fase S passa invece dal 30% nel controllo al 29% e 12% in quelle trattate con pinoresinolo e ATRA.

## Controllo Pinoresinolo 100 $\mu$ M



**Figura 19** Effetto proapoptotico, valutato mediante il metodo dell'Annessina V-FITC, sulle cellule HL60 esposte al trattamento con Pinoresinolo 100 $\mu$ M. La figura mostra i dati di un esperimento rappresentativo di 3 effettuati che davano risultati simili.



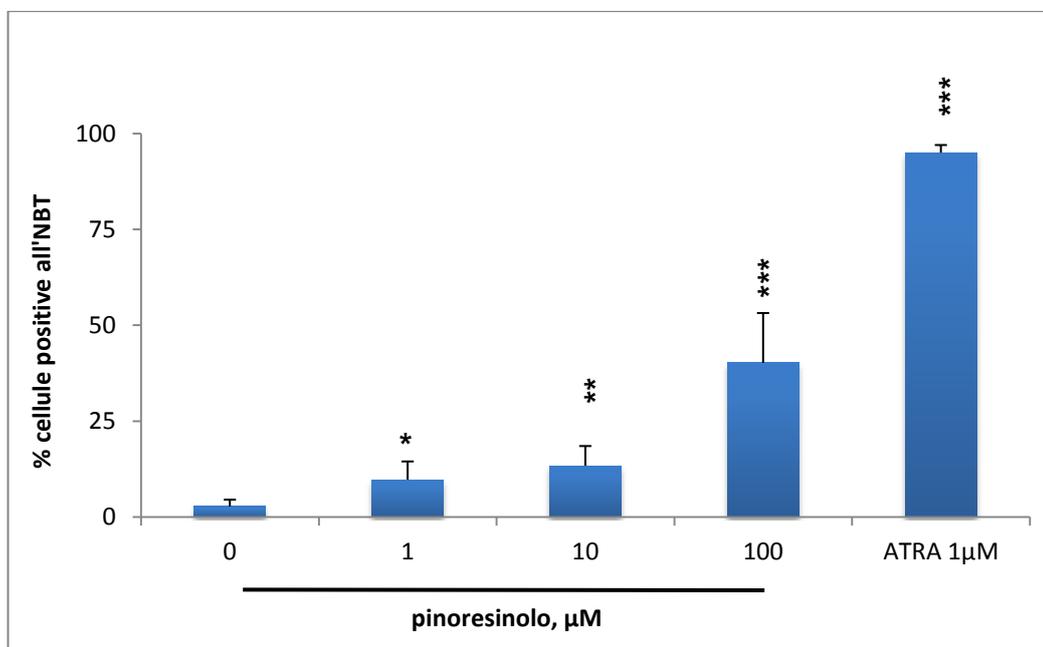
**Fig.20.** Effetto pro-apoptotico, valutato mediante il metodo del SubG1 ed effetto sul ciclo cellulare delle cellule HL60 esposte al trattamento con Pinoresinolo 100 $\mu$ M e con ATRA 1 $\mu$ M. I profili citofluorimetrici sono quelli di un esperimento rappresentativo mentre i valori riportati sono le media di 5 esperimenti indipendenti  $\pm$  SD.

### ***3.7.3. Analisi del differenziamento mediante il test dell’NBT***

La riduzione del Sali di NBT a formazano, come conseguenza della formazione di specie radicaliche dell’ossigeno, originatesi a loro volta in seguito all’attivazione della NADPH ossidasi all’interno delle cellule, aumenta all’aumentare della dose di Pinoresinolo, indicando che il trattamento con questo composto potrebbe essere in grado di avere un effetto differenziante. La percentuale di cellule positive all’NBT, valutata mediante il microscopio ottico dopo 96 ore di trattamento con la dose massima di pinoresinolo, è pari al 40% (Figura 21), mentre la densità ottica, a 715 nm nelle stesse condizioni, è pari a 0.93 (Figura 22). I valori ottenuti incubando per 96 ore le cellule con l’acido trans retinoico (ATRA) 1 $\mu$ M, come controllo positivo per l’induzione del differenziamento verso la linea granulocitaria, sono invece rispettivamente pari al 95% e a 1.56. L’effetto del Pinoresinolo sull’induzione del differenziamento, oltreché dose dipendente, risulta essere anche tempo dipendente: infatti, trattando le cellule per 24, 48, 72 e 96 ore con la dose massima di pinoresinolo, si osserva un aumento della densità ottica a 715 nm (Figura 23).

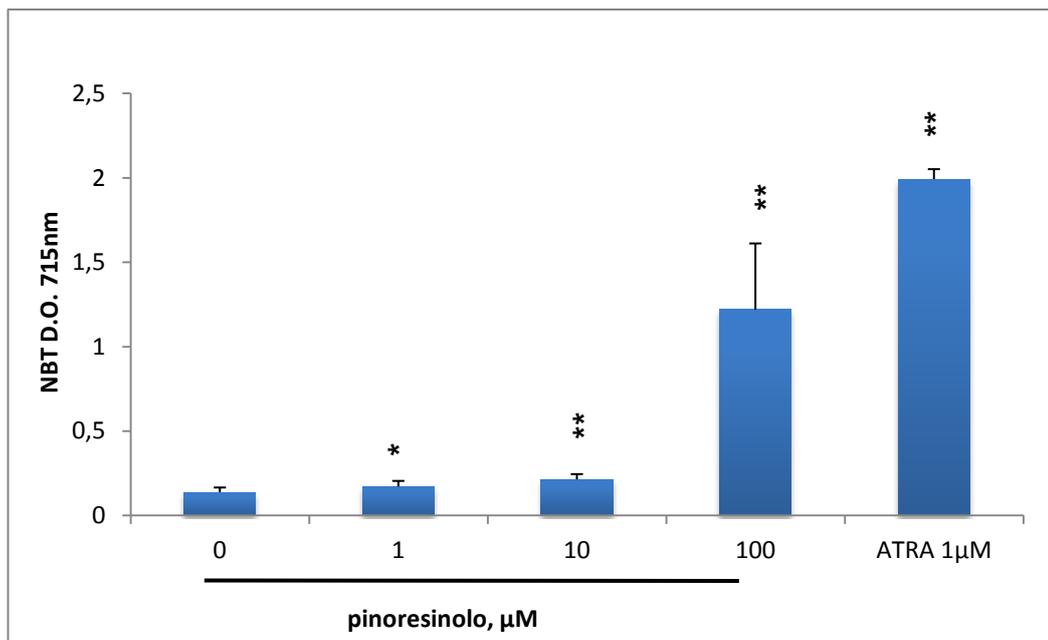
Il test dell’NBT è stato utilizzato anche per la valutazione dell’effetto di un inibitore delle MAPK, il PD98059, sull’induzione del differenziamento. Una delle possibili vie attraverso le quali viene indotto il differenziamento, coinvolge infatti le MAPK ERK1/2. Se la via coinvolta nell’induzione del differenziamento è mediata da ERK1/2 incubandole cellule con il pinoresinolo in presenza dell’inibitore, la percentuale di quelle che risultano essere positive al test dell’NBT, dovrebbe quindi diminuire. Dai dati riportati nella figura 26 si nota infatti che, sebbene i risultati non siano significativi, in presenza dell’inibitore la percentuale di cellule positive al test dell’NBT passa dal 32%, se trattate solo con il Pinoresinolo 100 $\mu$ M, al 17% se invece è presente il PD 98095 alla

concentrazione di 6  $\mu\text{M}$ . Lo stesso andamento si osserva andando a valutare la DO a 715 nm (Figura 25): in questo caso, all'aumentare della dose di PD utilizzata, l'assorbanza a 715 nm si riduce da 2.1, nelle cellule trattate con il pinoresinolo in assenza di inibitore, a 0.46, quando invece al terreno di coltura viene aggiunto anche il PD alla concentrazione di 6 $\mu\text{M}$ . l'effetto di inibizione dal parte del PD in questo caso è risultato significativo sia alla dose di 3  $\mu\text{M}$  che di 6 $\mu\text{M}$ .

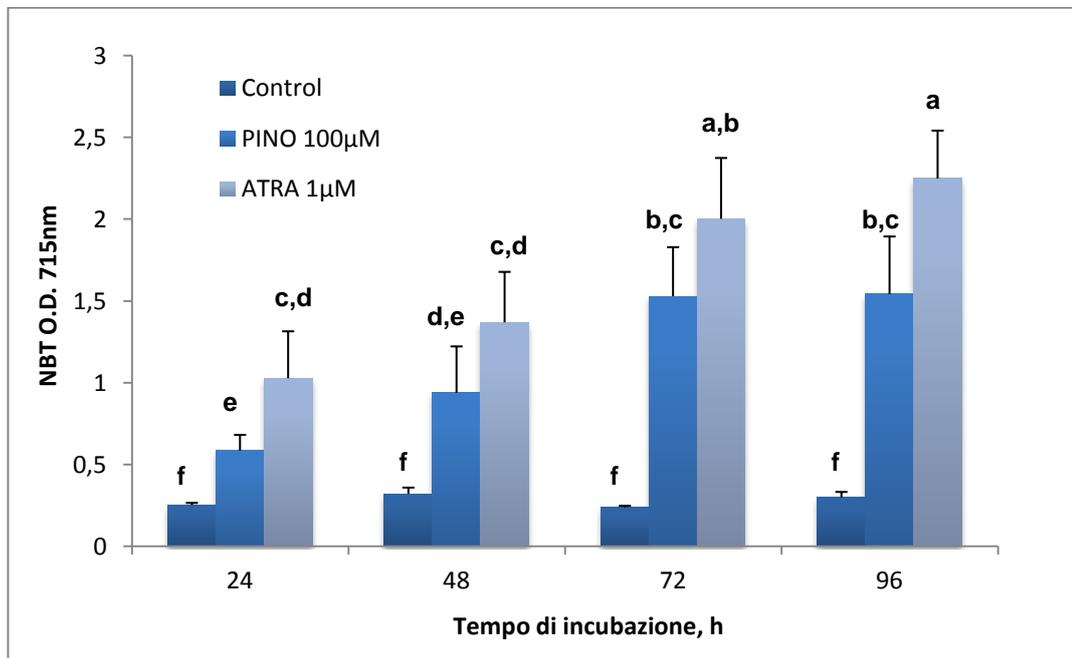


**Fig.21.** Effetto del pinoresinolo 1,10, 100 $\mu\text{M}$  e dell'ATRA 1 $\mu\text{M}$  sulla riduzione dei sali di nitro blu di tetrazolio (NBT) valutata dopo 96 ore di trattamento mediante microscopio ottico. I dati ottenuti sono la media di tre esperimenti indipendenti  $\pm$  DS.

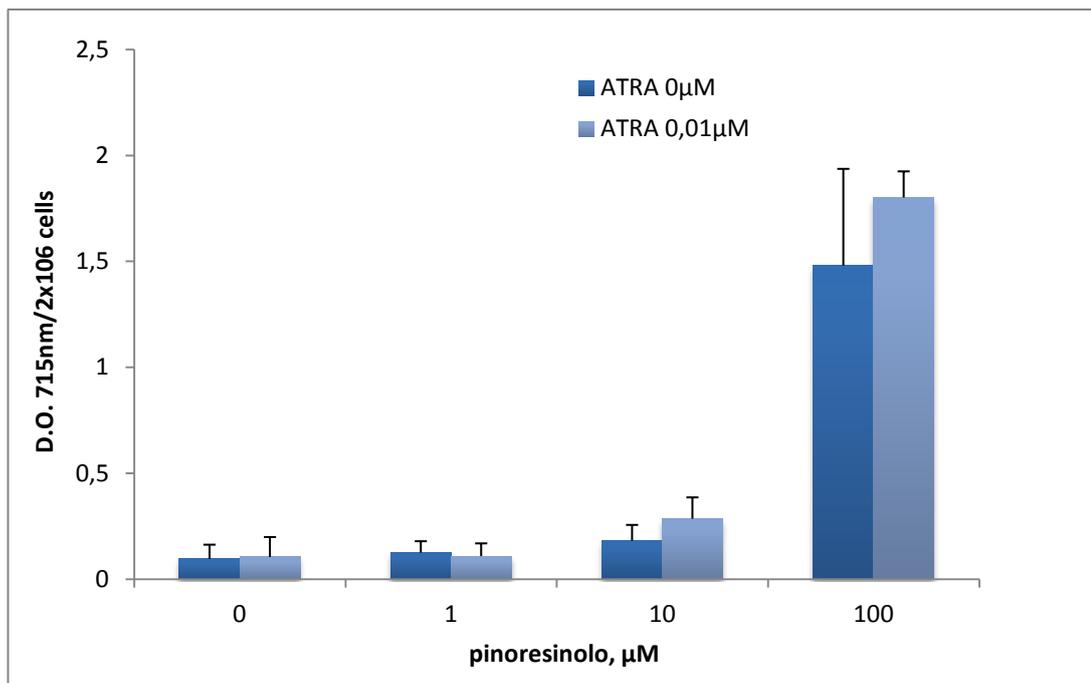
\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .



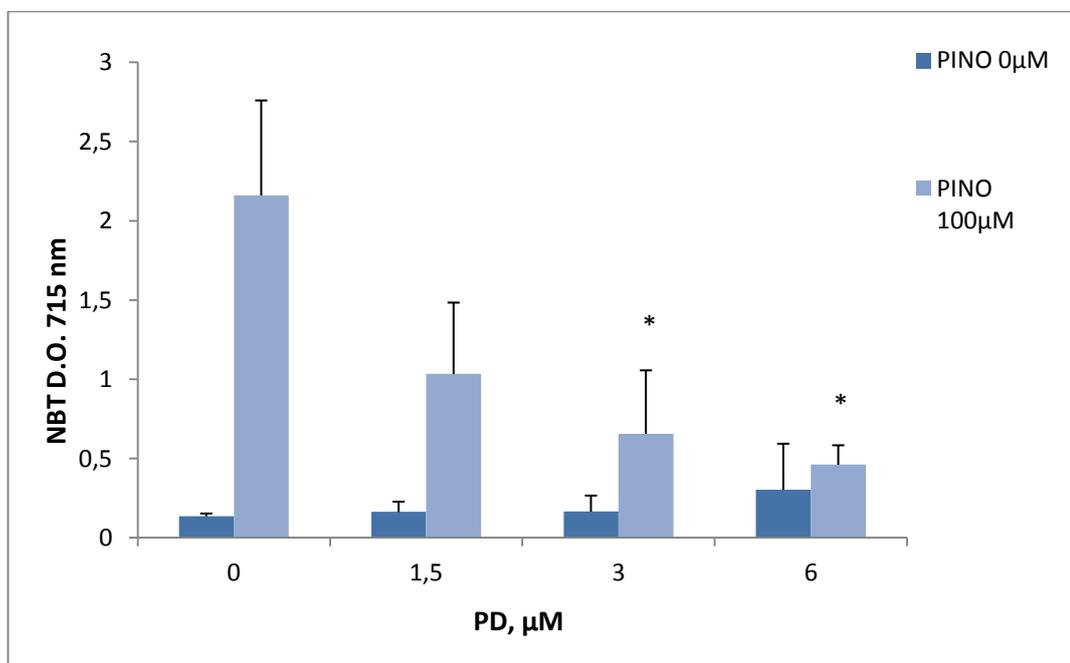
**Fig. 22.** Effetto del pinoselinolo 1, 10, 100µM e dell'ATRA 1µM sulla riduzione dei sali di nitro blu di tetrazolio (NBT) valutata dopo 96 ore di trattamento mediante spettrofotometria. I dati ottenuti sono la media di tre esperimenti indipendenti ± DS. \*p<0.05, \*\*p<0.01.



**Fig.23.** Effetto tempo dipendente del pinoselinolo 100µM e dell'ATRA 1µM sulla riduzione dei sali di nitro blu di tetrazolio, valutato mediante spettrofotometria. I dati ottenuti sono la media di tre esperimenti indipendenti ± DS. Le medie con lettere diverse differiscono per p<0.05.



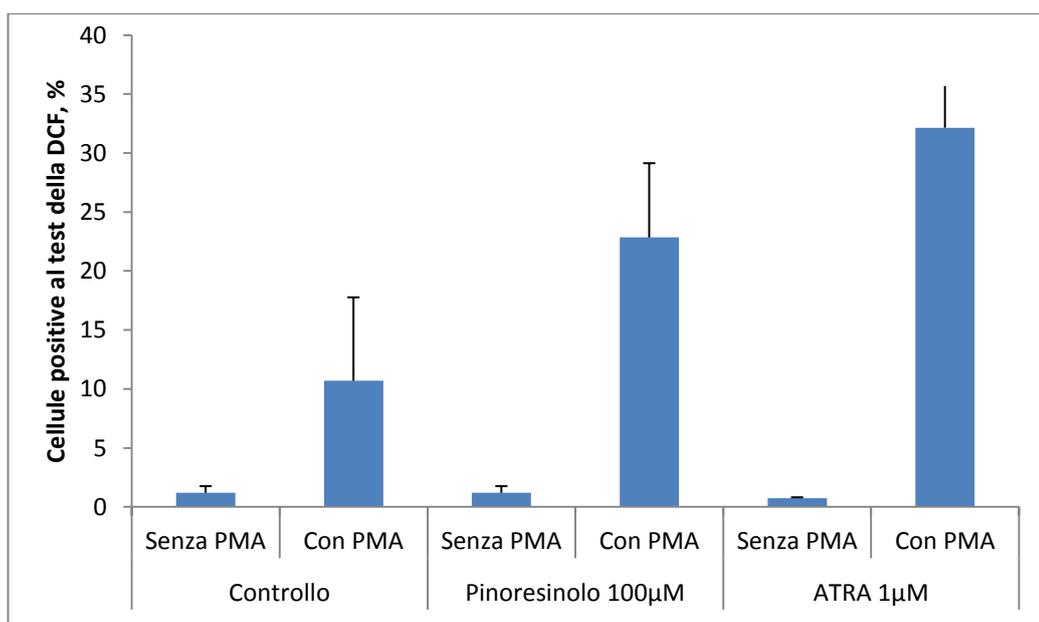
**Fig.24** Effetto combinato del Pinoresinolo (1, 10 e 100μM) e dell'ATRA (0.01μM) sulla riduzione dell'NBT valutato mediante la misura della densità ottica a 715 nm dopo 96 ore di trattamento. I dati ottenuti sono la media di cinque esperimenti indipendenti±DS.



**Fig. 25.** Effetti del PD9805, inibitore delle MAPK, dopo 96 ore di trattamento in presenza ed in assenza di pinoresinolo 100μM, sulla riduzione dei sali di nitro blu di tetrazolio (NBT) valutata mediante spettrofotometria. I dati ottenuti sono la media di tre esperimenti indipendenti ± DS. \*p<0.05.

### 3.7.4. Test della DCF-DA (DiCloroFluoresceina DiAcetato) e dei superossidi

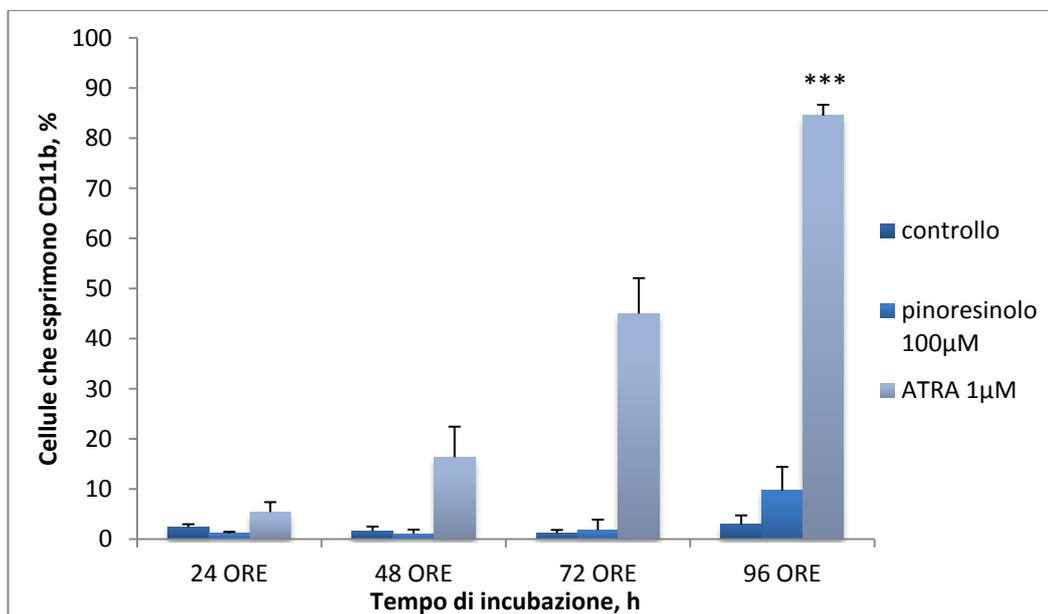
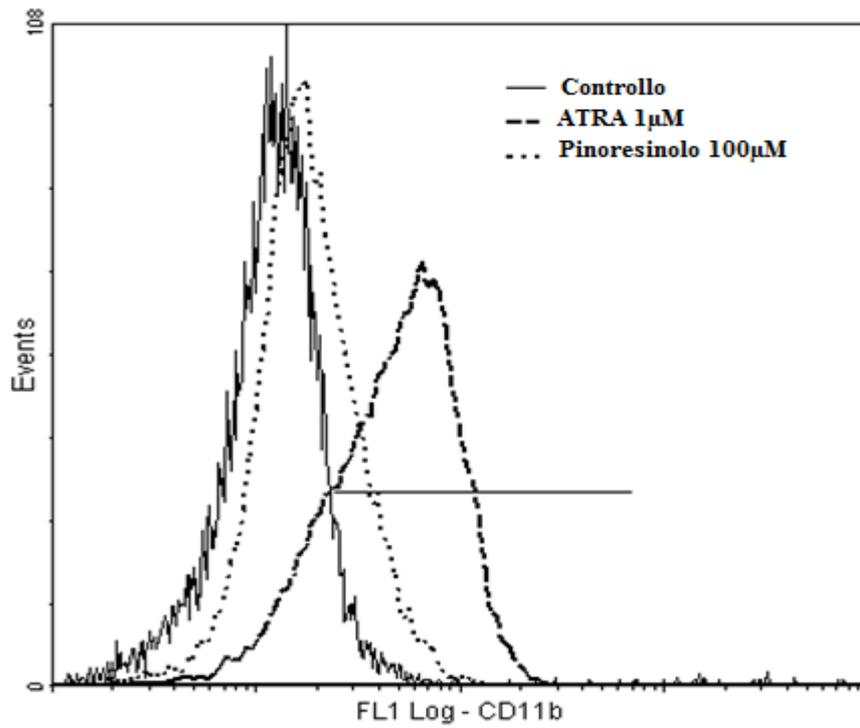
Per confermare i dati relativi all'attivazione della NADPH ossidasi, ottenuti mediante il test dell'NBT, abbiamo effettuato anche il test della DCF-DA e il test dei superossidi (dati non mostrati) quest'ultimo basato sulla riduzione dei citocromo-C da parte dei radicali superossido, che si generano in seguito all'attivazione dell'enzima. Dopo 96 ore di trattamento con pinoresinolo 100 $\mu$ M e ATRA 1 $\mu$ M in presenza di PMA (Forbolo Miristato Acetato), la percentuale di cellule che risultano positive al test della DCF-DA aumenta rispetto al controllo rispettivamente del 22% e del 32% e il dato relativo al trattamento con l'acido trans retinoico, risulta inoltre altamente significativo (Figura 26).



**Fig. 26.** Effetti del pinoresinolo 100 $\mu$ M e dell'ATRA 1 $\mu$ M sulla riduzione della DCF-DA, dopo 96 ore di trattamento. I dati ottenuti sono la media di tre esperimenti indipendenti  $\pm$  DS. \*\*\* $p < 0.001$ .

### **3.7.5. Espressione dell'antigene di superficie CD11b**

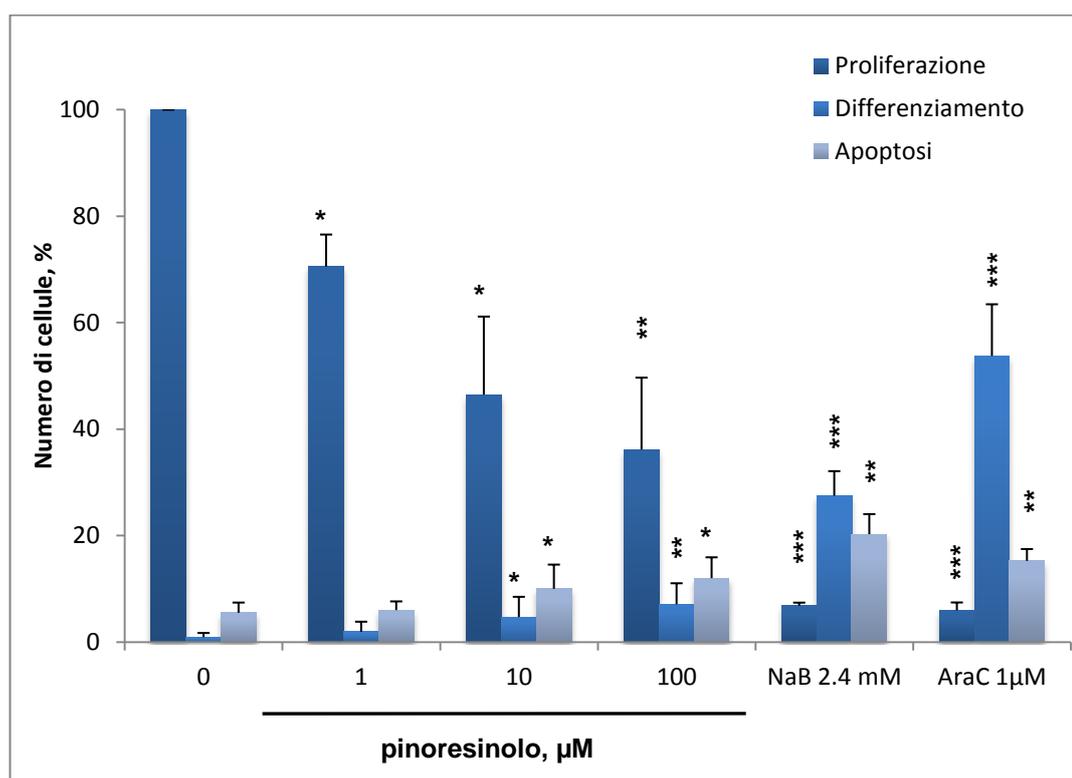
L'antigene di superficie CD11b, è uno dei marker che comunemente vengono valutati nel corso di uno studio sul differenziamento. La sua espressione può essere indotta nelle cellule leucemiche da una varietà di stimoli e, tra questi, l'ATRA rappresenta un efficace agente citodifferenziante. L'espressione del CD11b è limitata alle cellule mieloidi e dipende dallo stadio del differenziamento, per cui solo nei granulociti maturi e nei macrofagi sarà possibile identificarlo. Se invece le cellule si trovano ad uno stadio intermedio del processo di differenziamento, quale potrebbe essere quello di mielocita o di metamielocita, i livelli di espressione dell'antigene potrebbero risultare molto bassi o addirittura nulli (273). Per andare a valutare se il trattamento con pinoresinolo alla dose di 100µM, era in grado di indurre il differenziamento delle HL60 verso la linea granulocitaria, le cellule sono state incubate per 24, 48, 72 e 96, utilizzando come controllo positivo l'acido trans retinoico alla dose di 1µM. I dati ottenuti riportati in Figura 27, mostrano che il trattamento per 96 ore con l'ATRA induce nell'84% della popolazione cellulare in studio, un'espressione altamente significativa di questo antigene. Il pinoresinolo, a differenza di quanto atteso, ha invece un effetto molto blando, poiché solo nel 10% circa delle cellule analizzate è stato possibile riscontrare la presenza di questo antigene. Ciò è probabilmente una conseguenza del fatto che, le cellule trattate con il pinoresinolo non riescono a completare il processo di differenziamento, diventando granulociti maturi, ma sembrano piuttosto bloccate ad uno stadio intermedio.



**Fig. 27.** Effetti del pinoresinolo 100µM e dell'ATRA 1µM sull'espressione dell'antigene di superficie CD11b nelle HL60. I dati ottenuti sono la media di tre esperimenti indipendenti  $\pm$  DS. \*\*\* $p < 0.001$ .

### 3.7.6. Effetto antiproliferativo, proapoptotico e differenziante del pinoresinolo sulle cellule K562

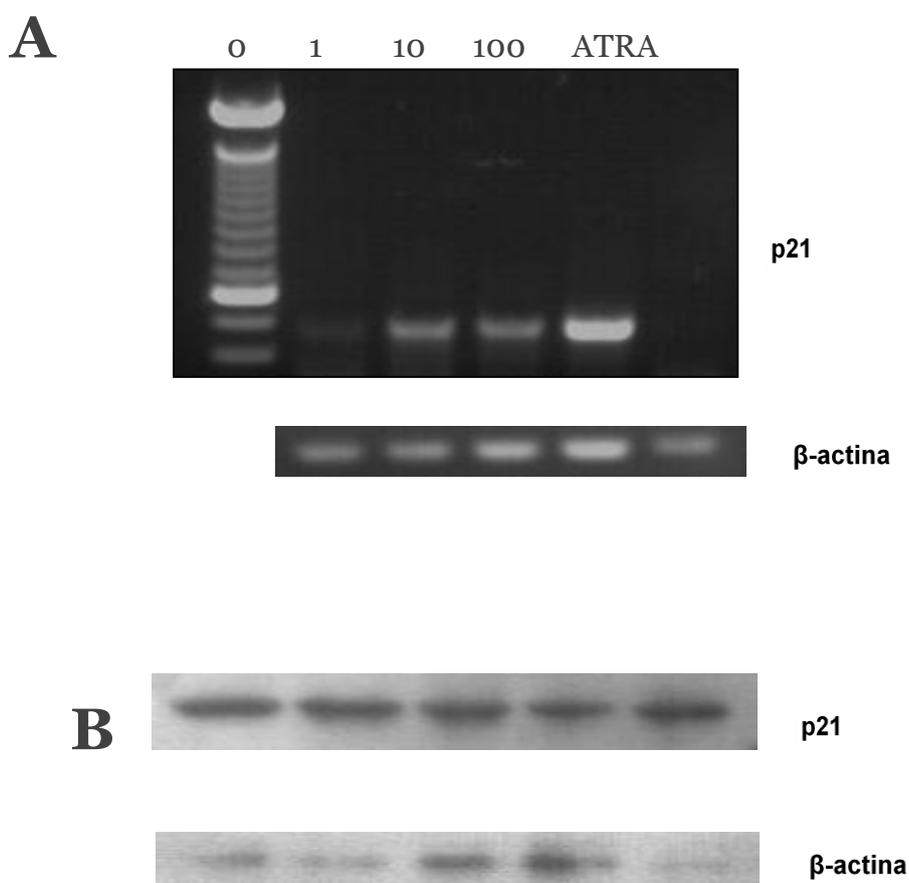
I dati relativi all'effetto antiproliferativo, proapoptotico e differenziante del pinoresinolo sulle K562 sono riportati in Figura 28. I risultati ottenuti indicano che il trattamento con pinoresinolo è in grado di esercitare un significativo effetto anti-proliferativo sulle cellule K562 a tutte le concentrazioni testate (1, 10 e 100 $\mu$ M), mentre un effetto piccolo, ma statisticamente significativo, è stato osservato per il differenziamento e l'apoptosi alle dosi di 10 e 100  $\mu$ M. Questi risultati indicano che il pinoresinolo è meno efficace nell'indurre il differenziamento nelle cellule K562 rispetto alle cellule HL60.



**Fig.28.** Effetto antiproliferativo, proapoptotico e differenziante del pinoresinolo 1, 10 e 100 $\mu$ M, sulle cellule di eritroleucemia K562. I dati riportati osno la media di tre esperimenti indipendenti  $\pm$  DS. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

### 3.7.7. Valutazione dell'espressione della p21

Gli effetti del trattamento delle HL60 con pinoresinolo 100 $\mu$ M e ATRA 1  $\mu$ M sull'espressione della p21, valutati sia mediante Western Blotting (pannello A) che mediante RT-PCR (pannello B), sono riportati in figura 29. I dati ottenuti in entrambi i casi indicano che, nelle cellule trattate per 96 ore con dosi crescenti di pinoresinolo (1, 10, e 100  $\mu$ M), l'espressione della proteina p21 aumenta all'aumentare della dose di pinoresinolo utilizzata.



**Fig.29. Pannello A:** Effetto sul trascritto genico della proteina p21 nelle HL60 dopo 96 ore di trattamento con pinoresinolo 1, 10 e 100 $\mu$ M. **Pannello B:** Effetto sui livelli di espressione della proteina p21 nelle HL60 dopo 96 ore di trattamento con pinoresinolo 1, 10 e 100 $\mu$ M.

### ***3.8. Effetti antiproliferativi e proapoptotici dei derivati di sintesi dell'idrossitirosolo sulle HL60, sulle HL60R e sulle cellule HCT116 ed SW480***

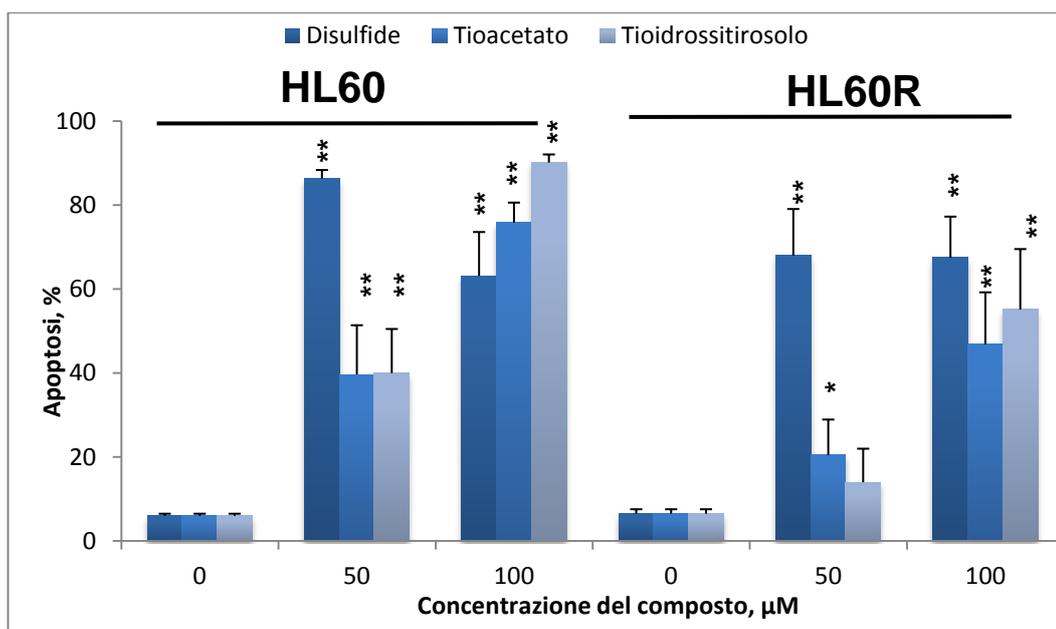
L'effetto proapoptotico dei derivati dell'idrossitirosolo sulle linee cellulari HL60 e HL60R, è stata valutato mediante microscopia a fluorescenza dopo 24 ore di trattamento (Figura 30). I dati ottenuti indicano che, nel caso del tioacetato e del tiolo, alle concentrazioni usate (50 e 100 $\mu$ M), l'effetto pro-apoptotico è risultato essere dose dipendente, mentre per la disulfide l'effetto massimo su entrambe le linee cellulari in studio, viene raggiunto già a 50  $\mu$ M. Il trattamento con entrambe le dosi di disulfide (50 e 100  $\mu$ M) è stato inoltre in grado di indurre la necrosi nelle HL60; di contro nelle cellule HL60R un effetto citotossico piccolo, ma statisticamente significativo, è stato osservato per tutti e tre i composti alle due dosi utilizzate. Ulteriori esperimenti, eseguiti utilizzando la disulfide in un range di concentrazioni più basse (12.5, 25 e 50  $\mu$ M), hanno messo in luce un effetto pro-apoptotico dose-dipendente anche per questo composto che anche alla dose più bassa (12,5  $\mu$ M) è risultato significativo per entrambe le linee cellulari. (Figura 31). Risultati simili sono stati ottenuti anche mediante citometria a flusso attraverso la determinazione del picco del sub-G1 (risultati non mostrati).

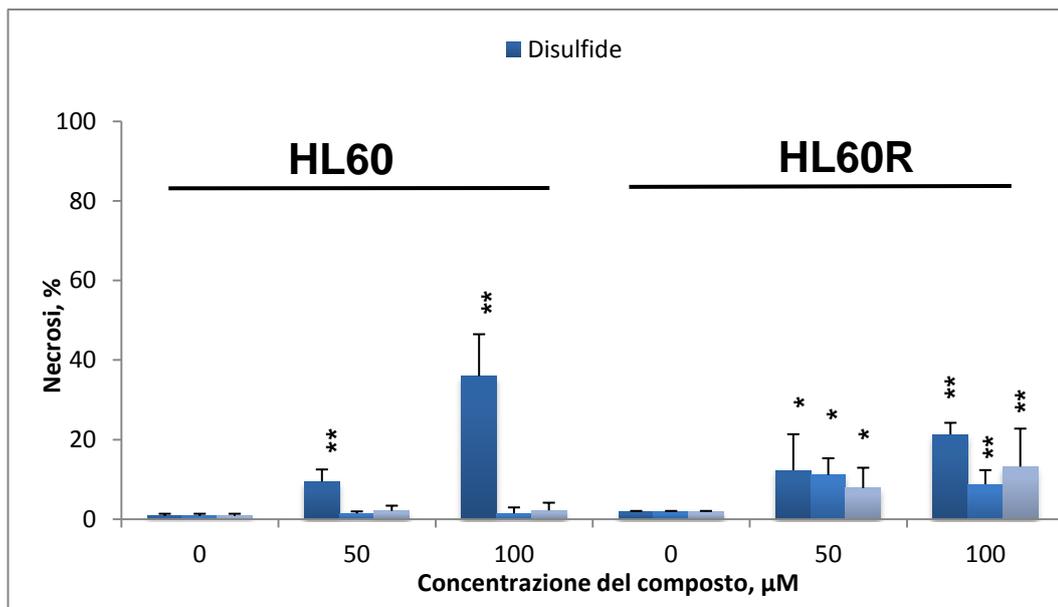
Studi condotti in passato nello stesso laboratorio, hanno dimostrato che l'effetto pro-apoptotico dell'idrossitirosolo è legato alla sua capacità di produrre e accumulare H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nel terreno di coltura (169). Ci siamo quindi chiesti se lo stesso fenomeno si verificasse in presenza dei suoi derivati di sintesi. Dopo aver incubato le cellule per 24 ore in presenza della dose massima dei differenti composti (100  $\mu$ M) e dell'aggiunta o meno dell'enzima catalasi (CAT: 100 U / ml), siamo andati a determinare l'accumulo di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nel terreno di coltura e l'apoptosi (Tabella 5). Come ci aspettavamo, in presenza di Idrossitirosolo si è osservato un aumento della concentrazione dell'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nel terreno di coltura delle HL60.

L'attività pro-apoptica dell'Idrossitirosole sulle HL60 è stata inoltre inibita significativamente dall'aggiunta della CAT (Tabella 5), a dimostrazione del fatto che questo effetto è mediato dall'aumento della concentrazione di  $H_2O_2$  nel terreno di coltura e che in presenza dell'enzima, riducendosi la quota di  $H_2O_2$ , si riduce di conseguenza anche la percentuale di cellule apoptotiche. Risultati diversi sono stati osservati incubando le cellule in presenza di tutti e tre i derivati dell'idrossitirosole: solo nel caso della disulfide si è avuto un notevole accumulo di  $H_2O_2$  nel terreno ma l'aggiunta dell'enzima CAT non ha ridotto significativamente la percentuale di cellule apoptotiche (Tabella 5). Nel caso di questo composto quindi l'effetto proapoptico non è mediato dall'accumulo  $H_2O_2$  nel terreno di coltura ma il meccanismo in gioco sembrerebbero essere altri. Per quanto riguarda gli effetti osservati sulle HL60R in presenza di Idrossitirosole, la percentuale di cellule apoptotiche risulta essere molto bassa, mentre tutti e tre i derivati di sintesi hanno mostrato un effetto proapoptico maggiore e statisticamente significativo. E' inoltre degno di nota che l'accumulo di  $H_2O_2$  nel terreno di coltura delle HL60R, sia dopo il trattamento con Idrossitirosole che con la disulfide, è stato nettamente inferiore rispetto a quanto osservato nelle HL60, possibilmente a causa del fatto che HL60R sono più attive nel rimuoverlo. I risultati ottenuti sono comunque molto incoraggianti e meriterebbero di essere approfonditi se si pensa che queste cellule sono resistenti al trattamento con i più comuni agenti chemioterapici, quali Citosina Arabinoside, 5-Fluorouracile, Cisplatino-11 e Daunorubicina (Tabella 5).

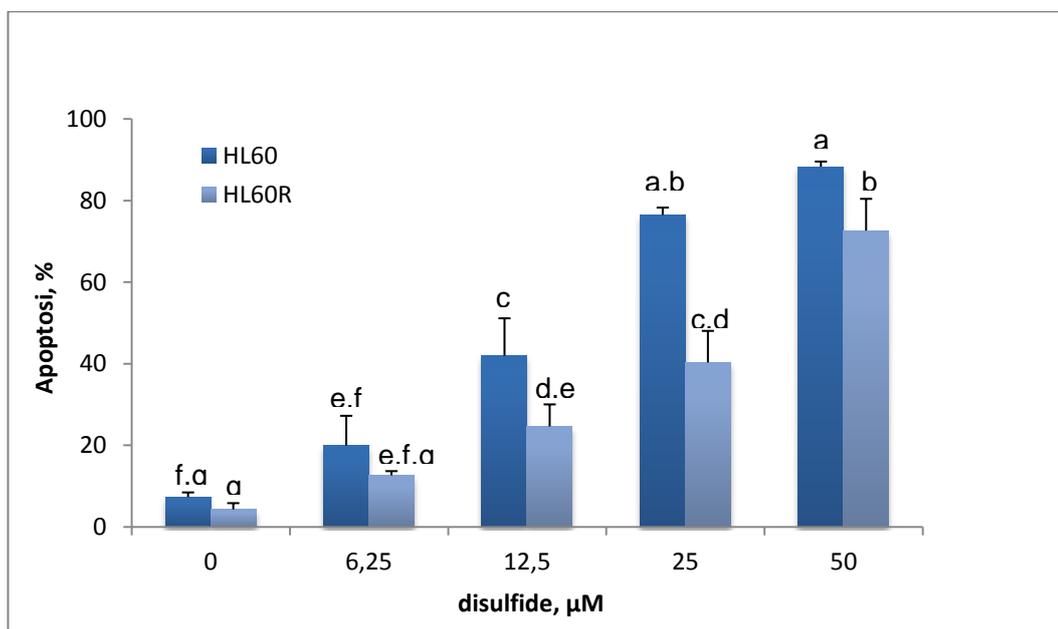
Al fine di valutare se l'effetto antiproliferativo dei composti di sintesi, derivati dall'Idrossitirosole, fosse diretto esclusivamente nei confronti delle HL60 e delle HL60R, gli stessi composti sono stati testati su due linee cellulari di tumore al colon, HCT116 e SW480. Dopo 96 ore di trattamento, la proliferazione in entrambe le linee cellulari, determinata mediante il test dell'MTT, è risultata

notevolmente inibita dal trattamento con tutti e tre i composti testati (25, 50, 75 e 100 $\mu$ M). I dati relativi alle IC<sub>50</sub> (concentrazione in grado di inibire la proliferazione delle cellule del 50%) per ciascun composto sulle due linee cellulari sono riportati in Tabella 6. Tutti e tre i composti hanno avuto un effetto altamente significativo nel ridurre la proliferazione delle due linee cellulari; il composto dotato di maggiore effetto sulla proliferazione delle HCT116 è risultato essere la Disulfide, la cui IC<sub>50</sub> è pari a 25.8 $\mu$ M, mentre il Tioolo è stato maggiormente efficace sulle SW480 (IC<sub>50</sub>, 15 $\mu$ M). E' degno di nota infine che l'effetto antiproliferativo di tutti e tre i composti sulle due linee cellulari è risultato essere maggiore rispetto a quello dell'Idrossitirosole, per il quale i valori di IC<sub>50</sub> sono stati 97.2 $\mu$ M e 64  $\mu$ M nelle HCT116 e nelle SW480 rispettivamente.





**Fig.31.** Effetti dei derivati dell'idrossitirosole sull'apoptosi (A) e sulla necrosi (B) di cellule di leucemia promielocitica umana HL60 e HL60R dopo 24 ore di trattamento con dosi crescenti dei tre derivati di sintesi dell'idrossitirosole. I risultati ottenuti sono la media di cinque esperimenti indipendenti  $\pm$  DS. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .



**Fig. 32.** Effetti della disulfide sull'apoptosi di cellule di leucemia promielocitica umana HL60 e HL60R dopo 24 ore di trattamento con dosi crescenti. I risultati ottenuti sono la media di cinque esperimenti indipendenti  $\pm$  DS. Le medie con lettere diverse differiscono per  $p < 0.05$ .

Trattamento	HL60			HL60R		
	Apoptosi %	Necrosi %	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> μM	Apoptosi %	Necrosi %	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> μM
Nessuno	5.8 ± 1.2 <sup>d</sup>	0.6 ± 0.5 <sup>c</sup>	0.4 ± 0.1 <sup>b</sup>	6.8 ± 1.1 <sup>e,f</sup>	2.3 ± 1.3 <sup>d</sup>	0.4 ± 0.1 <sup>c</sup>
Idrossitiroso	87.5 ± 6.4 <sup>a</sup>	5.70 ± 0.3 <sup>c</sup>	4.2 ± 0.6 <sup>a</sup>	24.4 ± 4.8 <sup>d,e</sup>	16.4 ± 8.4 <sup>b,c,d</sup>	1.6 ± 0.3 <sup>a</sup>
+CAT*	27.3 ± 8.9 <sup>d</sup>	1.50 ± 0.5 <sup>c</sup>	0.9 ± 0.4 <sup>b</sup>	20.0 ± 5.4 <sup>e,f</sup>	6.1 ± 5.6 <sup>d</sup>	1.0 ± 0.8 <sup>a,b,c</sup>
Disulfide	63.2 ± 10.4 <sup>c</sup>	36.0 ± 10.5 <sup>b</sup>	4.7 ± 1.0 <sup>a</sup>	67.5 ± 9.7 <sup>a</sup>	21.3 ± 2.9 <sup>b,c</sup>	1.2 ± 0.1 <sup>a,b</sup>
+CAT	72.0 ± 1.0 <sup>a,b,c</sup>	29.5 ± 2.6 <sup>b</sup>	0.5 ± 0.1 <sup>b</sup>	60.3 ± 11.1 <sup>a,b,c</sup>	26.6 ± 6.3 <sup>b</sup>	0.7 ± 0.1 <sup>b,c</sup>
Tioacetato	75.8 ± 4.8 <sup>a,b,c</sup>	1.5 ± 1.5 <sup>c</sup>	1.2 ± 0.4 <sup>b</sup>	46.8 ± 12.4 <sup>c</sup>	8.3 ± 3.5 <sup>c,d</sup>	0.4 ± 0.1 <sup>c</sup>
+CAT	65.4 ± 27.2 <sup>b,c</sup>	3.8 ± 2.8 <sup>c</sup>	0.5 ± 0.1 <sup>b</sup>	41.8 ± 11.4 <sup>c,d</sup>	5.2 ± 2.5 <sup>d</sup>	0.4 ± 0.1 <sup>c</sup>
Thiolo	90.1 ± 1.9 <sup>a</sup>	2.2 ± 1.9 <sup>c</sup>	N.D. <sup>§</sup>	55.1 ± 14.4 <sup>b,c</sup>	13.2 ± 9.6 <sup>b,c,d</sup>	N.D.
+CAT	86.9 ± 9.2 <sup>a,b</sup>	8.3 ± 8.2 <sup>c</sup>	N.D.	62.5 ± 9.1 <sup>a,b</sup>	10.2 ± 9.0 <sup>c,d</sup>	N.D.
DNR**	7.2 ± 5.3 <sup>d</sup>	92.8 ± 5.3 <sup>a</sup>	N.D.	3.2 ± 2.9 <sup>f</sup>	48.8 ± 11.9 <sup>a</sup>	N.D.
AraC***	71.5 ± 6.1 <sup>a,b,c</sup>	0.3 ± 0.2 <sup>c</sup>	N.D.	19.6 ± 8.7 <sup>e,f</sup>	4.8 ± 3.9 <sup>d</sup>	N.D.

**Tabella 5.** Effetti della CAT sull'apoptosi, necrosi e accumulo di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in presenza dei differenti composti di sintesi.

<b>Composto</b>	<b>HCT116</b>	<b>SW480</b>
Idrossitirosolo	97,2±13,3	64,0±14,4
Tioacetato	43,0±13,1***	20,1±7,3***
Disulfide	25,8±6,3***	19,2±4,8***
Tiolo	48,5±9,1***	15,0±1,8***

**Tabella 6.** Valori di IC<sub>50</sub>% della proliferazione delle cellule HCT116 e SW480 dopo 96 ore di trattamento. Confronto con Idrossitirosolo: \*\*\*p<0,001

## **4. DISCUSSIONE**

### ***4.1. Effetti chemio preventivi degli Estratti Fenolici***

Lo studio delle proprietà chemiopreventive di quattro estratti fenolici, ottenuti da oli extravergini di oliva di cultivar diverse (Ogliarola, Coratina, Nocellara e Taggiasca) ha mostrato che essi possiedono un diverso potenziale sulle cellule HL60. Le differenze relative alle proprietà antiproliferative e proapoptiche dei quattro estratti sono dovute alla diversa composizione fenolica e non dipendono invece dalla concentrazione totale dei fenoli. Il confronto tra l'attività proapoptotica e antiproliferativa degli estratti è stato effettuato trattando le cellule con la stessa dose in peso ( $\mu\text{g/ml}$ ) di composti fenolici totali che si traduce in una simile concentrazione dei fenoli totali (10 – 12 $\mu\text{M}$ ). I principali responsabili dell'attività chemio preventiva degli estratti sembrano essere i secoiridoidi, idrossitirosolo-EDA e tirosolo-EDA (oleocantale). È stata dimostrata infatti l'esistenza di una correlazione positiva tra la presenza di questi composti negli

estratti e la loro capacità antiproliferativa e proapoptotica. Tuttavia, dati ottenuti nel corso di studi precedenti hanno mostrato che la concentrazione dei singoli composti in grado di inibire la proliferazione e indurre l'apoptosi nelle cellule HL60, era maggiore di quella presente nel terreno di coltura in seguito all'aggiunta di 5µg/ml di estratto (170), a dimostrazione del fatto che, in presenza degli estratti, si verifica un effetto sinergico. Inoltre, tra i due derivati EDA il maggiore responsabile degli effetti chemiopreventivi sembra essere l'oleocantale. Infatti, testando sulle stesse cellule estratti ottenuti dalle acque reflue dalla lavorazione olearia, in cui questo composto è assente, l'attività antiproliferativa e proapoptotica risulta essere molto ridotta (dati non mostrati). In contrasto con i dati da noi ottenuti, altri Autori hanno dimostrato che, il trattamento delle cellule di cancro al colon RKO ed SW480, con estratti arricchiti in oleocantale, non è stato in grado di esercitare nessun effetto antiproliferativo sulle due linee cellulari.

Per quanto riguarda la presenza di una correlazione negativa tra la concentrazione del tirosolo e dell'idrossitirosolo e gli effetti chemiopreventivi degli estratti, bisogna innanzitutto considerare che questi composti si originano dall'idrolisi dei corrispondenti derivati EDA, per cui estratti in cui la concentrazione dei secoiridoidi è elevata, saranno poveri in tirosolo e idrossitirosolo e viceversa. Infatti, le concentrazioni presenti nel terreno di coltura per entrambi i composti, in seguito all'aggiunta di 5 µg/ml di estratto, sono più basse di quelle necessarie ad ottenere un effetto antiproliferativo e proapoptotico nelle HL60 (>250µM per il tirosolo e >10µM per l'idrossitirosolo).

L'effetto proapoptotico degli estratti non è mediato dal H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> che peraltro si accumula nel terreno di coltura in presenza degli stessi. In seguito all'aggiunta della CAT (100U/ml) non è stata infatti osservata una riduzione della percentuale di cellule apoptotiche, a dimostrazione del fatto che l'accumulo del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nel

terreno di coltura non è responsabile dell'effetto proapoptotico degli estratti. Questo può essere spiegato considerando che la concentrazione di  $H_2O_2$  che si accumula nel terreno di coltura in presenza degli estratti è molto bassa ( $<1\mu M$ ) e le cellule sono in grado di rimuoverla attivamente.

Il ruolo giocato dai lignani nel determinare l'attività chemiopreventiva degli estratti sembra essere molto complesso. L'esistenza di una correlazione negativa tra la loro concentrazione e gli effetti proapoptotici degli estratti ci ha portati innanzitutto a considerare la possibilità che questi composti potessero comportarsi da modulatori negativi del processo apoptotico. Per confermare la veridicità di questa ipotesi abbiamo trattato le cellule HL60 in presenza dell'estratto di Ogliarola (che si è rivelato il più attivo) e di concentrazioni crescenti di pinoselinolo. I dati ottenuti hanno mostrato che l'effetto proapoptotico dell'estratto di Ogliarola non è stato modificato dall'aggiunta del pinoselinolo a nessuna delle concentrazioni usate, portandoci ad escludere l'ipotesi che esso potesse avere un effetto inibente sull'induzione del processo apoptotico. Dati ottenuti da altri autori mostrano che questo composto è in grado di indurre il processo apoptotico in cellule di cancro al colon RKO e HCT116. Entrambe le linee cellulari hanno p53 funzionante, a differenza delle HL60 in cui la p53 è mutata, rendendo quindi conto, in parte, del diverso effetto osservato nel corso del nostro studio.

#### ***4.2. Effetti chemio preventivi dell'Idrossitirosolo***

Lo studio dell'attività chemiopreventiva dell'Idrossitirosolo ha permesso di dimostrare che l'attività proapoptotica di questo composto nei confronti delle HL60 è mediata dalla produzione extracellulare e all'accumulo nel terreno di coltura di  $H_2O_2$ . La capacità dell'idrossitirosolo di accumulare  $H_2O_2$  nel terreno di coltura non è inoltre dovuta all'interazione con alcuni dei componenti in esso

presenti, poiché tale fenomeno è stato osservato anche in presenza di PBS. Tuttavia, la produzione di  $H_2O_2$  da parte dell'idrossitirosolo dipende dalle condizioni in cui viene allestita la coltura cellulare, in particolare dalla capacità tampone del mezzo, dal pH e dalla presenza di piruvato nella formulazione dei terreni usati. In particolare per quanto riguarda la presenza di piruvato, dati ottenuti da altri Autori hanno dimostrato che esso è in grado di agire da scavenger nei confronti di alcuni agenti ossidanti, tra i quali l' $H_2O_2$ , proteggendo i fibroblasti dai loro effetti citotossici (23).

In relazione al meccanismo attraverso il quale l'idrossitirosolo è in grado di accumulare  $H_2O_2$  nel terreno di coltura, la reazione iniziale potrebbe essere quella che coinvolge la sua ossidazione, da parte dell' $O_2$ , con formazione di un semichinone, altamente instabile, che successivamente si ossiderà formando il corrispondente orto-chinone e  $O_2^{\cdot-}$ . L'equilibrio di questa reazione può essere perturbato dall'azione della tirosinasi, che rimuovendo gli atomi di idrogeno dall'anello catecolico dell'idrossitirosolo e formando direttamente l'orto-chinone, lo sposterà verso sinistra, avendo un effetto inibitorio, e potenziata dalla riduzione della concentrazione degli ioni  $H^+$  (quindi aumentando il pH) che sposterà l'equilibrio verso destra, favorendo la formazione dell'orto chinone. L'ossidazione del catecolo può avvenire anche in presenza di alcuni metalli di transizione, come ad esempio il rame ed il ferro, sebbene nel nostro sistema questa reazione non sembra essere importante. Infatti, in presenza di chelanti di questi metalli, la produzione di  $H_2O_2$  da parte dell'idrossitirosolo non viene inibita (dati non mostrati). L'anione superossido prodotto ( $O_2^{\cdot-}$ ) durante l'ossidazione dell'anello catecolico dell'idrossitirosolo, può essere convertito in  $H_2O_2$  attraverso una reazione spontanea o una dismutazione catalizzata dalla superossidismutasi (SOD). Questo enzima può influenzare la produzione di  $H_2O_2$ , comportandosi sia da ossidante che da riducente dell' $O_2^{\cdot-}$  (274) e quindi

promuovendo o inibendo l'accumulo di  $H_2O_2$ . Altri autori hanno infatti riportato che la SOD è in grado di ridurre l'accumulo di  $H_2O_2$  causato dall'epigallocatechina gallato (275 - 277), dalla miricetina (278) e dalla flavina-3',3'-digallato (279), mentre potenzia l'accumulo di  $H_2O_2$  indotto dal *para*-amminofenolo (280). Nelle nostre condizioni, la presenza dell'enzima ha accelerato l'accumulo dell'  $H_2O_2$ . Infine, bisogna considerare anche che l'idrossitirosolo può interagire con le specie reattive dell'ossigeno (tra cui  $O_2^{\cdot-}$  e  $H_2O_2$ ), comportandosi come un potente scavenger nei loro confronti (281, 282) e avendo quindi sia un'attività pro-ossidante che antiossidante, in relazione alle condizioni sperimentali che influenzano le sue attività biologiche "in vitro" and "in vivo".

#### **4.3. Effetti chemio preventivi del pinoresinolo**

A differenza dei ben noti effetti dell'idrossitirosolo, l'attività chemio preventiva dei lignani sembra essere molto complessa. Infatti, come è stato precedentemente descritto, la loro presenza negli estratti fenolici è negativamente correlata alla capacità che essi hanno di indurre l'apoptosi nelle HL60. Tuttavia, incubando le cellule in presenza dell'estratto con la maggiore attività proapoptotica e di diverse concentrazioni di pinoresinolo, la percentuale di cellula apoptotiche è rimasta invariata, mostrando che questo non composto non si comporta come un inibitore del processo apoptotico. La maggior parte degli studi riguardanti le proprietà chemiopreventive del pinoresinolo sono stati condotti su cellule tumorali che, a differenza delle HL60, esprimono costitutivamente la p53. Su queste cellule il pinoresinolo è stato in grado di esercitare sia un effetto antiproliferativo che proapoptotico.

La fase successiva del nostro lavoro è stata quindi quella di andare a valutare sulle HL60 gli effetti del pinoresinolo come composto singolo e non facente parte di una miscela fenolica. I risultati ottenuti sono stati molto incoraggianti poiché il

pinoresinolo, sebbene dotato di una scarsa attività proapoptica, si è rivelato comunque in grado di inibire la proliferazione delle cellule: HL60, HL60R, K562, HCT116, SW480, MCF-7, MDA-MB231, LNCap e PC3, anche se a concentrazioni ben al di sopra di quelle presenti negli estratti. L'inibizione della proliferazione, osservata in seguito al trattamento delle K562 con il pinoresinolo, è accompagnata da un effetto piccolo, ma statisticamente significativo, sul differenziamento. L'effetto antiproliferativo del pinoresinolo sulle HL60 è accompagnato dall'aumento della percentuale di cellule nella fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> del ciclo cellulare. L'arresto del ciclo cellulare in fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> è inoltre confermato dall'aumento sia del trascritto genico che dei livelli di espressione della p21, uno degli inibitori delle complessi chinasi ciclina-dipendenti la cui attivazione è fondamentale per la corretta progressione del ciclo cellulare attraverso le varie fasi. La presenza di un significativo effetto antiproliferativo unito a una scarsa capacità proapoptica ci ha portati ad ipotizzare che, in seguito al trattamento con il pinoresinolo, potesse essere indotto il differenziamento. Le cellule di leucemia promielocitica umana HL60 possono essere indotte a differenziare sia verso la linea granulocitaria che verso quella monocitaria (283, 284), in relazione allo stimolo a cui esse sono sottoposte. Il trattamento con ATRA o con DMSO è infatti in grado di indurre nelle HL60 l'acquisizione di un fenotipo caratteristico dei granulociti, mentre il trattamento con la vitamina D<sub>3</sub> è in grado di indurre il differenziamento verso la linea monocitaria (285-287). Il fenotipo caratteristico delle HL60, che sono state esposte al trattamento con l'ATRA o con il DMSO, sarà caratterizzato dalla presenza di nuclei segmentati e bilobati, tipici dei neutrofilii; di contro, in seguito al trattamento con la vitamina D<sub>3</sub>, si avrà la comparsa di nuclei reniformi o "a fagiolo" che sono invece caratteristici dei monociti (287). In entrambi i casi, nelle cellule differenziate o verso la linea granulocitaria o verso quella monocitaria, si osserva l'attivazione della NADPH ossidasi, un enzima che catalizza la produzione di superossido, a partire da NADPH e O<sub>2</sub>. L'enzima è un

complesso formato da due componenti di membrana, tre componenti citosoliche e una proteina G che, in condizioni normali, si trovano in forma inattiva all'interno dei neutrofili. Durante il burst respiratorio attivato in conseguenza della fagocitosi le subunità citosoliche vengono traslocate e si assemblano con le componenti di membrana, formando l'ossidasi attiva che è ora in grado di produrre superossido e perossido di idrogeno, ossigeno e specie radicaliche, finalizzate all'uccisione dei patogeni (288). La conferma dell'attivazione di questo enzima è stata ottenuta sia spettrofotometricamente (test dell'NBT) che mediante citometria a flusso, (test della DCF e il test dei superossidi). Alla luce di questi risultati, siamo andati quindi a valutare, nelle cellule trattate con il pinoresinolo, l'eventuale aumento dell'espressione dell'antigene di superficie CD11b. Come controllo positivo abbiamo utilizzato l'ATRA, un efficace agente citodifferenziante verso la linea granulocitaria. L'espressione del CD11b è ristretta alle cellule mieloidi e dipende dallo stadio a cui si trova il differenziamento, quindi, solo nei granulociti maturi e nei macrofagi troveremo elevati livelli di CD11b (289). Gli elevati livelli di espressione di questo antigene di superficie, che si osservano incubando le cellule con l'ATRA, indicano che lo stimolo differenziante è efficace nel produrre il differenziamento a granulociti maturi. Di contro, i livelli di espressione molto bassi che si riscontrano nelle cellule trattate con il pinoresinolo, potrebbero suggerire che la stimolazione non sia stata sufficiente a produrre granulociti maturi ma che il differenziamento si sia interrotto ad uno stadio intermedio, ad esempio a quello di mielocita o di metamielocita. Come riportato da diversi autori, il differenziamento è un processo regolato dall'espressione e dall'attivazione programmata e sequenziale di appropriate proteine chinasi. Le proteine chinasi giocano infatti un ruolo chiave nelle cascate di trasduzione del segnale, grazie alla loro capacità di fosforilare altre chinasi e proteine che sono coinvolte nella regolazione di importanti processi cellulari, quali ad esempio la progressione attraverso le varie fasi del ciclo e il

differenziamento (290). Nelle cellule leucemiche l'induzione del differenziamento è correlata all'attivazione delle MAPK. Nel caso delle HL60, il trattamento con l'ATRA porta infatti all'attivazione di alcuni recettori trans membrana a tirosina chinasi i quali, attraverso la cascata RAF/RAS/MEK, modulano a loro volta l'attivazione delle MAPK, ERK1 ed ERK2 (291, 292). Incubando le cellule in presenza di un inibitore specifico dell'ERK2, il PD98095, il differenziamento indotto dall'ATRA viene infatti inibito (292). Ci siamo allora chiesti se l'effetto del pinosresinolo sull'induzione del differenziamento fosse mediata dalla stessa via che è attivata dal trattamento con l'ATRA. Abbiamo quindi incubato le HL60 con il pinosresinolo 100µM presenza ed in assenza dell'inibitore e siamo andati a valutare l'attivazione della NADPH ossidasi mediante il test dell'NBT. Dai dati ottenuti è emerso che nelle cellule trattate con il PD la D.O. a 715nm, misurata dopo 96 ore di trattamento, è pari a 0.46 mentre nelle cellule trattate con il pinosresinolo, in assenza dell'inibitore, è pari a 2.16 confermando il coinvolgimento dell'attivazione delle MAPK nell'induzione del differenziamento.

#### ***4.4. Effetti chemio preventivi dei derivati di sintesi dell'idrossitirosolo: disulfide, tioacetato e tiolo***

Lo studio delle attività chemiopreventive dei derivati di sintesi dell'idrossitirosolo ha messo in evidenza, per la prima volta, la capacità da parte di questi composti di indurre un notevole effetto proapoptotico sia sulle cellule HL60 che HL60R. In particolare, il composto che si è rivelato maggiormente attivo nell'indurre l'apoptosi è stato la disulfide: il massimo effetto proapoptotico si è avuto infatti alla dose più bassa (50µM), su entrambe le linee cellulari. Gli altri due composti, alle dosi utilizzate, hanno invece dimostrato di possedere un effetto dose dipendente che è stato per altro trovato anche nel caso della disulfide, trattando entrambe le linee cellulari con concentrazioni inferiori a 50µM. Tutti e tre i composti sono stati inoltre in grado di attivare il processo di necrosi: sebbene la

percentuale di cellule necrotiche sia piuttosto bassa, l'effetto per tutti e tre i composti e su entrambe le linee cellulari è stato comunque significativo. Il meccanismo d'azione di questi composti sembra essere diverso da quello dell'idrossitiroolo, in particolare per quanto riguarda il ruolo giocato dall' $H_2O_2$ . In primo luogo infatti, solo la disulfide e il tioacetato sono in grado di accumulare  $H_2O_2$  nel terreno di coltura e la concentrazione solo nel caso della disulfide risulta simile a quella osservata in presenza di Idrossitiroolo, mentre è molto basso in presenza del Tioacetato. Inoltre, la concentrazione di  $H_2O_2$  che si accumula nel terreno di coltura delle HL60R è inferiore rispetto a quella trovata in presenza delle HL60, suggerendo che le HL60R siano in grado di detossificare più efficacemente questo composto. Infine, incubando le cellule in presenza di Catalasi, la percentuale di cellule apoptotiche non viene variata, suggerendo che il meccanismo d'azione di questi composti non rende conto della presenza dell' $H_2O_2$ . Il dato più importante che è emerso nel corso di questo studio riguarda tuttavia gli effetti di questi composti sulle cellule HL60R. Per dimostrare l'efficacia di questi composti sulla linea cellulare resistente li abbiamo messi a confronto con dei più comuni farmaci utilizzati nel trattamento delle leucemie, l'Ara-C e la doxorubicina. L'Ara-C agisce selettivamente sulle cellule che si trovano in fase S, comportandosi come un antimetabolita: viene infatti convertito in citosina arabinoside trifostato il quale si comporta innanzitutto da inibitore della DNA polimerasi, entrando in competizione con il suo substrato naturale deossicitidina trifostato, e in secondo luogo, provoca una duplicazione aberrante del nuovo DNA, in quanto viene incorporato durante la sua sintesi. La doxorubicina è un antraciclina che esercita i suoi effetti sia come intercalante, inserendosi tra le basi del DNA e bloccandone la sintesi, che come inibitore enzimatico agendo sull'attività della topoisomerasi II. Gli effetti di questi composti sull'apoptosi e sulla necrosi delle HL60R, sebbene significativi, sono risultati inferiori rispetto a quelli esercitati dai derivati dell'idrossitiroolo i quali

sono stati in grado di indurre il processo apoptotico in maniera più efficace rispetto anche all'idrossitirosole, prospettandosi come possibili candidati da usare nella la reversione della resistenza in questo tipo di cellule tumorali.

Infine, per valutare se gli effetti citotossici dei derivati di sintesi dell'idrossitirosole fossero diretti solo verso le HL60 o si avevano anche in presenza di altre linee cellulari tumorali, abbiamo trattato le cellule di cancro al colon HCT116 ed SW480 con l'idrossitirosole e tutti e tre i derivati di sintesi. Gli effetti ottenuti sull'inibizione della proliferazione sono stati molto interessanti: infatti, su entrambe le linee cellulari e per tutti e tre i composti in studio il dato è stato altamente significativo.

## **5. CONCLUSIONI**

Al termine di una ricerca triennale volta allo studio degli effetti chemiopreventivi dei composti fenolici derivati da oli extravergini di oliva di cultivar nazionali su cellule di leucemia promielocitica umana HL60 e HL60R, i risultati ottenuti possono essere riassunti nei seguenti punti.

1. I composti fenolici esercitano un effetto chemiopreventivo maggiore quando testati come facenti parte di una miscela complessa rispetto all'azione che essi hanno come singoli composti, probabilmente a causa della presenza di un effetto sinergico tra i vari componenti della miscela stessa.

Le condizioni sperimentali influenzano la capacità dell'idrossitirosole di comportarsi come agente antiossidante o pro ossidante. L'attività proossidante dell'idrossitirosole, responsabile dei suoi effetti chemiopreventivi, è legata alla sua capacità di accumulare  $H_2O_2$  nel terreno di coltura, come dimostrato dalla riduzione significativa della percentuale di cellule apoptotiche in presenza della catalasi, un enzima in grado di detossificare il  $H_2O_2$ . L'aumento della concentrazione del  $H_2O_2$  nel terreno di coltura è dovuta alla ossidazione

dell'anello catecolico con formazione del corrispondente orto chinone e anione superossido, il quale verrà successivamente convertito in  $H_2O_2$  nel corso di una reazione di dismutazione che può essere sia spontanea che catalizzata dalla SOD.

2. Il ruolo dei lignani nel modulare l'attività chemio preventiva degli estratti è molto complesso. Questi composti presenti in una miscela complessa sono negativamente correlati all'attività antiproliferativa e propoptotica delle stesse. Tuttavia, il pinoresinolo testato singolarmente è stato in grado di indurre il differenziamento nelle HL60, aumentando la concentrazione dei superossidi presenti nel terreno di coltura, prodotti in seguito all'attivazione della NADPH ossidasi. Lo stimolo differenziante non è tuttavia sufficiente ad indurre il completo differenziamento delle HL60 verso la linea granulocitaria, a differenza di quanto osservato in seguito al trattamento con l'acido trans retinoico, poiché l'espressione dell'antigene di superficie per i granulociti CD11b è molto ridotta rispetto a quanto osservato in seguito al trattamento con l'ATRA. Il meccanismo differenziante del pinoresinolo sembra coinvolgere l'attivazione della via mediata dalle MAPK, ERK1/2 come dimostrato in seguito alla riduzione della concentrazione di superossidi nel terreno incubando le cellule in presenza di inibitore specifico delle MEK, il PD98059.

3. I composti di sintesi derivati dall'idrossitirosolo in seguito all'aggiunta sull'anello catecolico di gruppi funzionali solforati, testati per la prima volta su cellule di leucemia promielocitica umana HL60 e HL60R e su cellule di tumore al colon HCT116 ed SW480, hanno mostrato un notevole potenziale chemiopreventivo, legato alla capacità che essi hanno di inibire la proliferazione tutte e quattro le linee cellulari in studio e di indurre l'apoptosi sia nelle HL60 che nelle HL60R. Il risultato più interessante, che merita ulteriori approfondimenti, riguarda, in particolare, l'effetto proapoptotico sulle cellule HL60R le quali non

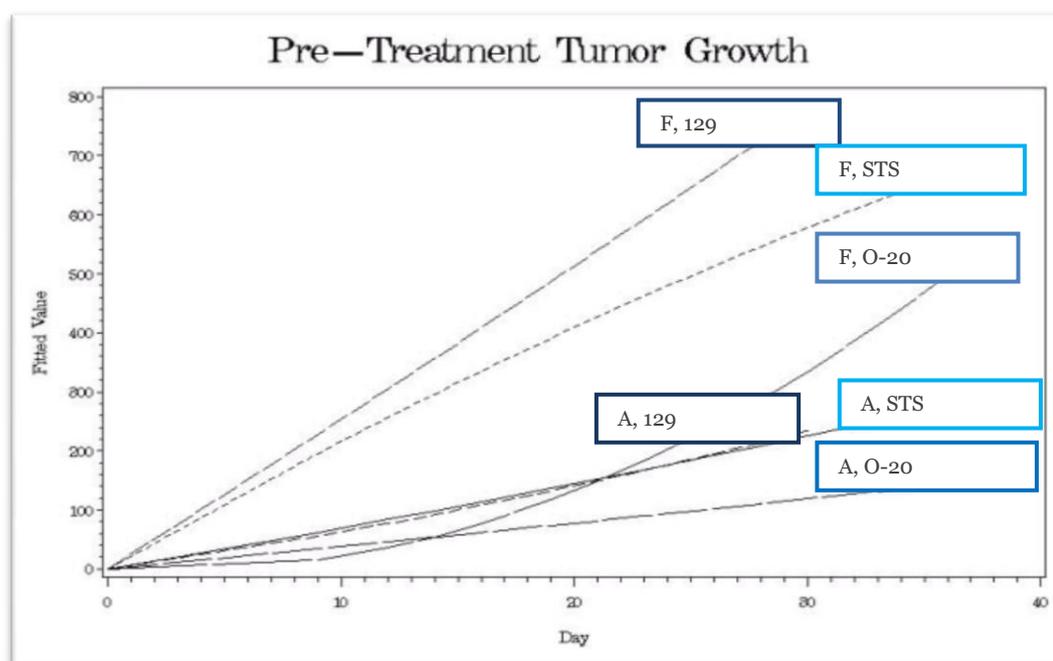
rispondono al trattamento con i comuni farmaci antitumorali e si sono rivelate invece sensibili al trattamento con questi composti.

Poiché i risultati ottenuti nel corso degli studi in vitro sopra descritti sono stati molto incoraggianti, abbiamo preso in considerazione la possibilità di poter studiare anche “in vivo”, su opportuni modelli sperimentali animali, gli effetti chemiopreventivi dei polifenoli dell'olio di oliva. Nell'ottica di individuare un modello sperimentale animale appropriato per tale tipo di studi abbiamo di recente stabilito una collaborazione con il Prof. Peter Demant del Dipartimento di Biologia Cellulare e molecolare del Roswell Park Cancer Institute di Buffalo, New York, USA. Nel suo laboratorio vengono attualmente condotte diverse linee di ricerca, incluso uno studio, nel quale siamo direttamente coinvolti, che utilizza modelli sperimentali murini i quali, per le loro peculiarità, potrebbero essere adatti per i nostri studi. I dati preliminari sino ad ora ottenuti riguardano la valutazione degli effetti tossici dell'Irinotecano (CPT-11) su tre differenti ceppi murini, STS, 129 ed O-20, i quali differiscono per la diversa suscettibilità nei confronti delle ADR (Adverse Drug Reaction). L'Irinotecano è un agente chemioterapico usato principalmente nel trattamento del cancro al colon metastatico e del cancro a piccole cellule del polmone ed è uno dei più usati nelle terapie combinate (293, 294). Agisce stabilizzando i complessi ternari tra la topoisomerasi I e il dsDNA (double stranded DNA), con conseguente arresto della forchetta replicativa e rottura della struttura a doppia elica del DNA (295). È un pro-farmaco solubile in acqua che, a livello epatico, viene convertito dalle carbossimetilesterasi 2 nel metabolita maggiormente attivo, 7-etil-10-idrossi-camptotecina (SB-389) (296, 297). I tre ceppi murini mostrano la stessa tendenza a sviluppare tumori al polmone (298). Per la crescita dei tumori primari sono state utilizzate due linee cellulari di

carcinomi umani a cellule squamose del collo e della testa (HNSCC), A235 e FaDu ottenute dalla American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). Le cellule ( $3 \times 10^6$  /150 $\mu$ l) sono state mantenute in coltura in monostrato e iniettate sottocute in topi Athymic Nude per la crescita dei tumori primari. Quando i tumori hanno raggiunto dimensioni pari a 250mm<sup>3</sup>, i topi sono stati sacrificati, i tumori recuperati e sezionati in modo da ottenere xenografts del peso di 10mg che sono stati impiantati bilateralmente nei topi STS, 129 e O-20.

Quando la crescita dei tumori secondari ha raggiunto dimensioni pari a 150mm<sup>3</sup>, si è iniziato il trattamento con CPT-11, 100mg/kg di peso corporeo. I topi sono trattati una volta a settimana per 4 settimane somministrando il farmaco per via intraperitoneale. La comparsa di reazioni avverse, quali diarrea o perdita di peso è stata monitorata quotidianamente. La riduzione delle dimensioni dei tumori è stata valutata tre volte a settimana utilizzando un calibro digitale. I dati relativi alla velocità di crescita degli xenotrapianti nei topi STS, 129 e O-20 sono riportati nella Figura 1. Dai dati ottenuti è emerso che, a parità di strain, la velocità di crescita dei tumori derivati dalle cellule FaDu risulta essere maggiore rispetto a quanto osservato per i tumori derivati dalle cellule A253 e questo andamento è mantenuto in tutti e tre gli strain considerati; nei mice O-20, la velocità di crescita di entrambi i tumori A253 e FaDu risulta inferiore rispetto a quanto osservato nei topi STS e 129. L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il metodo Restricted Maximum Likelihood (REML) : in questo metodo le stime non sono basate su tutti i dati raccolti ma solo sulla presenza di contrasti all'interno del set di dati da analizzare. l'analisi statistica ha mostrato che, a parità di strain, le differenze nella velocità di crescita dei due differenti tipi tumorali sono altamente significative, in particolare negli strain 129 e O-20; a parità di tumore, mettendo a confronto i tre strain nessun effetto significativo è stato osservato nella velocità di crescita di quelli derivati dalle A253; un effetto altamente significativo si è avuto invece per la velocità di crescita dei tumori

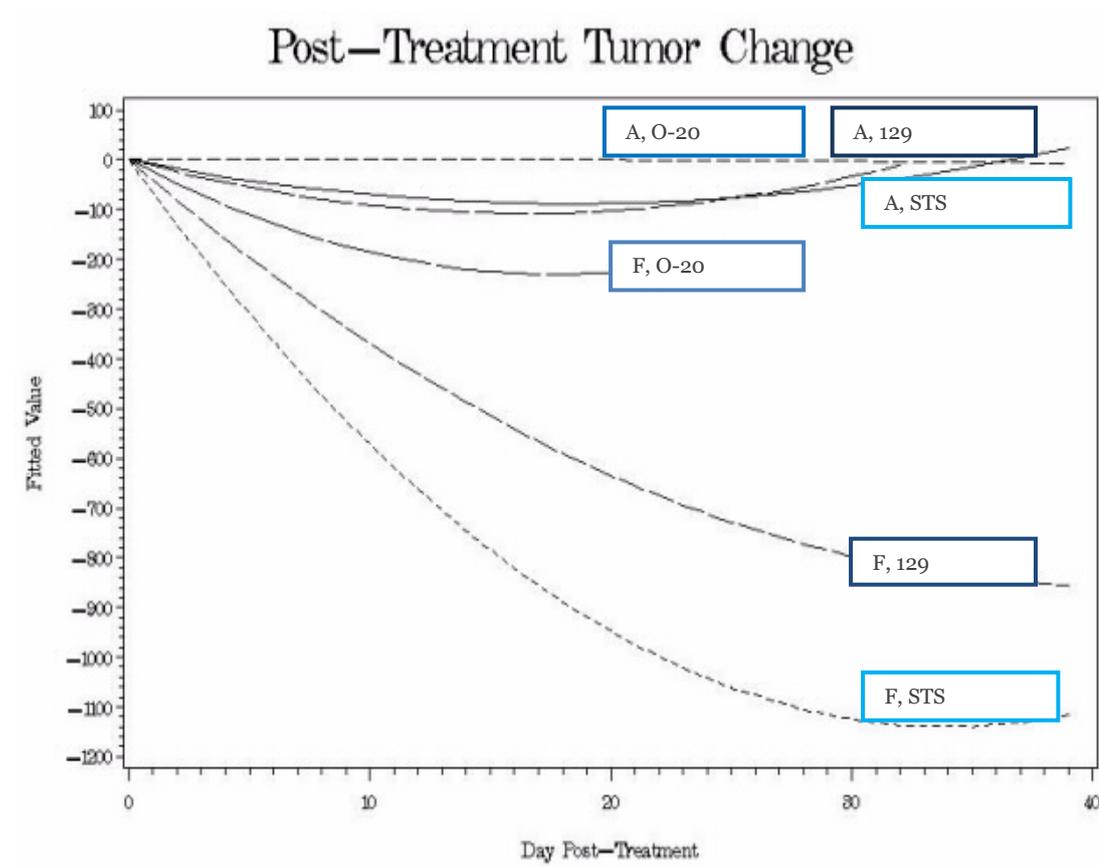
derivati dalle FaDu: infatti, il ritardo nella crescita dei tumori derivati dalle FaDu, osservato nei topi O-20, è risultato altamente significativo quando messo a confronto con la crescita dello stesso tipo tumorale negli altri due strains, STS e 129.



**Fig. 1A** Andamento della crescita tumorale degli xenotrapianti in topi STS, 129 e O-20. L'analisi della significatività statistica dei risultati ottenuti è riportata in Tabella 1A.

Gli effetti relativi al trattamento con Irinotecano dei tumori derivati dalle cellule A253 e dalle cellule FaDu sono riportati in figura 2A. I risultati ottenuti mostrano che, a parità di strain, la velocità con cui le dimensioni della massa tumorale diminuiscono è maggiore nei tumori derivati dalle cellule FaDu rispetto a quelli derivati dalle cellule A253; a parità di tumore, nei topi STS la velocità di riduzione delle dimensioni di entrambi i tumori è risultata essere maggiore rispetto a quanto osservato nei topi 129 e O-20. L'analisi statistica dei dati ottenuti ha messo in evidenza che, a parità di strain, le differenze nella velocità con cui si riducono le dimensioni dei tumori derivati dalle cellule FaDu rispetto a quelli derivati dalle cellule A253, sono altamente significative nei topi STS e 129 trattati

con Irinotecano, mentre nessun effetto significativo è stato osservato nei topi O-20; a parità di tumore, mettendo a confronto i tre strain, il trattamento con Irinotecano non ha avuto un effetto significativo nella velocità di riduzione delle dimensioni dei tumori derivati dalle A253, ma è risultato significativo nel trattamento dei tumori derivati dalle FaDu, in particolare mettendo a confronto i topi STS con quelli O-20.



**Fig. 2A.** Effetto del trattamento con CPT-11 (100mg/kg di peso corporeo) nei topi STS, 129 e O-20.

## 5.1 BIBLIOGRAFIA

1. Tolone G., *Oncologia Generale*, IV ed. 2004, Medical Books.

2. De Angelis R, Grande E, Inghelmann R, Francisci S, Micheli A, Baili P, Meneghini E, Capocaccia R, Verdecchia. *A Cancer prevalence estimates in Italy from 1970 to 2010*. Tumori, 93: 392-397, 2007
  
3. DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA, DePinho RA, Weinberg RA. *Cancer: Principle and Practice of Oncology*. Lippincott Williams & Wilkins 9th Ed. , 2011
  
4. Wilson TR, Longley DB, Johnston PG. *Chemoresistance in solid tumours*. Ann Oncol. 2006 Sep;17 Suppl 10:x315-24
  
5. Couto E, Boffetta P, Lagiou P, Ferrari P, Buckland G, Overvad K, Dahm CC, Tjønneland A, Olsen A, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Cottet V, Trichopoulos D, Naska A, Benetou V, Kaaks R, Rohrmann S, Boeing H, von Ruesten A, Panico S, Pala V, Vineis P, Palli D, Tumino R, May A, Peeters PH, Bueno-de-Mesquita HB, Büchner FL, Lund E, Skeie G, Engeset D, Gonzalez CA, Navarro C, Rodríguez L, Sánchez MJ, Amiano P, Barricarte A, Hallmans G, Johansson I, Manjer J, Wirfält E, Allen NE, Crowe F, Khaw KT, Wareham N, Moskal A, Slimani N, Jenab M, Romaguera D, Mouw T, Norat T, Riboli E, Trichopoulou A. *Mediterranean dietary pattern and cancer risk in the EPIC cohort*. Br J Cancer. 2011 Apr 26;104(9):1493-9. Epub 2011 Apr 5.
  
6. Keys A. *Seven countries: a multivariate analysis of death and coronary heart disease*. Cambridge, MA: Harvard University Press, 1980.
  
7. Farchi G, Capocaccia R, Verdecchia A, Menotti A, Keys A. *Risk factors changes and coronary heart disease in an observational study*. Int J Epidemiol. 1981 Mar;10(1):31-40.
  
8. Benetou V, Trichopoulou A, Orfanos P, Naska A, Lagiou P, Boffetta P. et al. *Conformity to traditional Mediterranean diet and cancer incidence: the Greek EPIC cohort*. Br J Cancer 2008;99:191-5.

9. Keys, A., Menotti, A., Karvonen, M. J., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Djordjevic, B. S., Dontas, A. S., Fidanza, F., and Keys, M. H. *The diet and 15-year death rate in the seven countries study*. Am. J. Epidemiol. 1986; 124, 903–915
10. Sofi F, Cesari F, Abbate R, Gensini GF, Casini A. *Adherence to Mediterranean diet and health status: meta-analysis*. BMJ 2008;337:a1344.
11. Trichopoulou A, Costacou T, Bamia C, Trichopoulos D. *Adherence to Mediterranean diet and survival in a Greek population*. NEnglJMed 2003; 348:2599-608.
12. Riboli E, Hunt KJ, Slimani N, Ferrari P, Norat T, Fahey M, et al. *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC):study populations and data collection*. Public Health Nutr 2002;5:1113-24.
13. Slimani N, Kaaks R, Ferrari P, Casagrande C, Clavel-Chapelon F, Lotze G, et al. *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) calibration study: rationale, design and population characteristics*. Public Health Nutr 2002;5:1125-45.
14. Aggarwal BB, Shishodia S. *Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer*. Biochem Pharmacol 2006;71:1397-1421.
15. Tripoli E, Giammanco M, Tabacchi G, Di Majo D, Giammanco S, La Guardia M. *The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health*. Nutrition Research Reviews 2005; 18: 98-112.
16. Servili, M., & Montedoro, G. F. *Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality*. European Journal of Lipid Science and Technology, 2006; 104, 602-613.

17. Servili M., Selvaggini R., Esposito S., Taticchi A., Montedoro GF., Morozzi G.. *“Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil”*. Journal Chromatography, 2004; 1054: 113-127.
18. Keys AB. *Seven countries: a multivariate analysis of death and coronary heart disease*. Harvard University Press, Cambridge 1980
19. Garcia-Segovia P, Sanchez-Villegas A, Doreste J, Santana F, Serra-Majem L. *Olive oil consumption and risk of breast cancer in the Canary Islands: a population-based case-control study*. Public Health Nutr. 2006; 9:, 163-67.
20. Trichopoulou A, Katsouyanni K, Stuver S, Tzala L, Gnardellis C, Rimm E, Trichopoulos D. *Consumption of olive oil and specific food groups in relation to breast cancer risk in Greece*. J. Natl. Cancer Inst. 1995; 82: 110-6.
21. Martin-Moreno JM, Willett WC, Gorgojo L, Banegas JR, Rodriguez-Artalejo F, Fernandez-Rodriguez JC, Maisonneuve P, Boyle P. *Dietary fat, olive oil intake and breast cancer risk*. Int. J. Cancer 1994; 58: 774-80.
22. La Vecchia C, Negri E, Franceschi S, Decarli A, Giacosa A, Lipworth L. *Olive oil, other dietary fats, and the risk of breast cancer (Italy)*. Cancer Cause Control 1995; 6: 545-50.
23. Norrish AE, Jackson RT, Sharpe SJ, Skeaff CM. *Men who consume vegetable oils rich in monounsaturated fat: their dietary patterns and risk of prostate cancer (New Zealand)*. Cancer Cause Control 2000; 11: 609-15.

24. Hodge AM, English DR, McCredie MR, Severi G, Boyle P, Hopper JL, Giles GG. *Foods, nutrients and prostate cancer*. *Cancer Causes Control*. 2004; 15: 11-20.
25. Braga C, La Vecchia C, Franceschi S, Negri E, Parpinel M, Recarli A, Giocosa A, Trichopoulos D. *Olive oil, other seasoning fats, and the risk of colorectal carcinoma*. *Cancer* 1998; 82: 448-53.
26. Lasekan JB, Clayton MK, Gendron-Fitzpatrick A, Ney DM. *Dietary olive and safflower oils in promotion of DMBA-induced mammary tumorigenesis in rats*. *Nutr. Cancer* 1990; 13: 153-63.
27. Bartoli R, Fernández-Bañares F, Navarro E, Castellà E, Mañé J, Alvarez M, Pastor C, Cabré E, Gassull MA. *Effect of olive oil on early and late events of colon carcinogenesis in rats: modulation of arachidonic acid metabolism and local prostaglandin E(2) synthesis*. *Gut* 2000; 46: 191-99.
28. Ichihashi M, Ahmed NU, Budiyanto A, Wu A, Bito T, Ueda M, Osawa T. *Preventive effect of antioxidant on ultraviolet-induced skin cancer in mice*. *J. Dermatol. Sci.* 2000; 23: S45-50.
29. Thuy NT, He P, Takeuchi H. *Comparative effect of dietary olive, safflower, and linseed oils on spontaneous liver tumorigenesis in C3H/He mice*, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 2001; 47: 363-66.
30. Stark A., Madar Z.. *Olive oil as a functional food: epidemiology and nutritional approaches*. *Nutrition. Review*, 2002; 60: 170-176.
31. Owen,R.W, Giacosa,A., Hul,W.E., Haubner,R., Wurtele,G., Spiegelhalder,B. and Bartsch,H. () *Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants*. *Lancet Oncol.* 2000; 1, 107-112
32. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. *Polyphenols: Food sources and bioavailability*. *Am J Clin Nutr* 2004; 79:727-747.

33. Bravo L. Polyphenols: *Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance*. Nutr Rev 1998; 56:317–333.
34. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. *Polyphenols: Food sources and bioavailability*. Am J Clin Nutr 2004; 79:727–747
35. Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: *Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties*. Molecules 2010; 15:7313–7352.
36. Visioli F, Galli C. *Olive oil polyphenols and their potential effects on human health*. J Agric Food Chem 1998; 46:4292–4296.
37. M.-I. Covas. *Bioactive effects of olive oil phenolic compounds in humans: reduction of heart disease factors and oxidative damage*. Inflammopharmacology 16 2008 216–218. Review
38. Montserrat Fito', Rafael de la Torre and Maria-Isabel Covas. *Olive oil and oxidative stress Mol. Nutr. Food Res.* 2007, 51, 1215 – 1224.
39. Fito', M., Covas, M. I., Lamuela-Ravents, R. M., Vila, J., et al., *Protective effect of olive oil and its phenolic compounds against low density lipoprotein oxidation*. Lipids 2000; 35, 633–638.
40. Masella, R., Vari, R., D'Archivio, M., Di Benedetto, R., et al., *Extra virgin olive oil biophenols inhibit cell-mediated oxidation of LDL by increasing the mRNA transcription of glutathione-related enzymes*. J. Nutr. 2004; 134, 785–791.
41. Visioli, F., Bellomo, G., Montedoro, G., Galli, C., *Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents*. Atherosclerosis 1995, 117, 25–32.

42. Zhao B. Natural antioxidants protect neurons in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Neurochem Res* 2009; 34:630–638.
43. Joseph J, Cole G, Head E, Ingram D. *Nutrition, brain aging, and neurodegeneration*. *J Neurosci* 2009; 29:12795–12801.
44. Gutierrez-Merino C, Lopez-Sanchez C, Lagoa R, Samhan-Arias AK, Bueno C, Garcia-Martinez V. *Neuroprotective actions of flavonoids*. *Curr Med Chem* 2011; 18:1195–1212.
45. Sies H. *Polyphenols and health: Update and perspectives*. *Arch Biochem Biophys* 2010; 501:2–5.
46. Grassi D, Desideri G, Croce G, Tiberti S, Aggio A, Ferri C. *Flavonoids, vascular function and cardiovascular protection*. *Curr Pharm Des* 2009; 15:1072–1084.
47. Michalska M, Gluba A, Mikhailidis DP, Nowak P, Bielecka-Dabrowa A, Rysz J, Banach M. *The role of polyphenols in cardiovascular disease*. *Med Sci Monit* 2010; 16:RA110–RA119.
48. Agouni A, Lagrue-Lak-Hal AH, Mostefai HA, Tesse A, Mulder P, Rouet P, Desmoulin F, et al. *Red wine polyphenols prevent metabolic and cardiovascular alterations associated with obesity in Zucker fatty rats (Fa/Fa)*. *PLoS ONE* 2009; 4:e 5557.
49. Cherniack EP. *Polyphenols: Planting the seeds of treatment for the metabolic syndrome*. *Nutrition* 2011; 27:617–623.
50. Milne JC, Lambert PD, Schenk S, Carney DP, Smith JJ, Gagne DJ, Jin L, et al. *Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes*. *Nature* 2007; 450:712–716.

51. Zunino S. *Type 2 diabetes and glycemic response to grapes or grape products*. J Nutr 2009; 139:1794S–1800S.
52. Borriello A, Cucciolla V, Della Ragione F, Galletti P. *Dietary polyphenols: Focus on resveratrol, a promising agent in the prevention of cardiovascular diseases and control of glucose homeostasis*. Nutr Metab Cardiovasc Dis 2010;20:618–625.
53. Ferrari CK. *Functional foods, herbs and nutraceuticals: Towards biochemical mechanisms of healthy aging*. Biogerontology 2004;5:275–289.
54. Mataix J, Quiles JL, Huertas JR, Battino M, Mañas M. *Plasma antioxidants are strongly affected by iron-induced lipid peroxidation in rats subjected to physical exercise and different dietary fats*. Biofactors. 1998; 8(1-2):119-27. Free Rad Biol Med 1998; 24: 511-21
55. Paiva-Martins F., Gordon MH., Gameiro P.. *Activity and location of olive oil phenolic antioxidants in liposomes*. Chemistry Physical Lipids, 2003 Jun; 124: 23-36.
56. Owen RW., Giacosa A., Hull WE., Haubner R., Spiegelhalter B., Bartsch H.. *The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil*. European Journal Cancer, 2000 Jun; 36: 1235-47.
57. Deiana M., Aruoma OI., Bianchi ML., Spencer JP., Kaur H., Halliwell B., Aeschbach R., Banni S., Dessi MA., Corongiu FP.. *Inhibition of peroxynitrite dependent DNA base modification and tyrosine nitration by the extra virgin olive oil-derived antioxidant hydroxytyrosol*. Free Radical Biologic Medical, 1999 Mar; 26: 762-9
58. Salvini S, Sera F, Caruso D, Giovannelli L, Visioli F, Saieva C, Masala G, Ceroti M, Giovacchini V, Pitozzi V, Galli C, Romani A, Mulinacci N, Bortolomeazzi R, Dolara P, Palli D. *Daily consumption of a high-phenol extra-virgin olive oil reduces oxidative DNA damage in postmenopausal women*. Br. J. Nutr. 2006; 95: 742-51.

59. Finkel T, et al. *Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing*. Finkel T, Holbrook NJ. Nature. 2000 Nov 9;408(6809):239-47. Review.
60. Quiles JL, Mesa MD, Ramírez-Tortosa CL, Aguilera CM, Battino M, Gil A, Ramírez-Tortosa MC. *Curcuma longa extract supplementation reduces oxidative stress and attenuates aortic fatty streak development in rabbits*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2002 Jul 1;22(7):1225-31.
61. Trichopoulou A, Lagiou P, Kuper H, Trichopoulos D. *Cancer and Mediterranean dietary traditions*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2000 Sep;9(9):869-73. Review.
62. Bartolí R, Fernández-Bañares F, Navarro E, Castellà E, Mañé J, Alvarez M, Pastor C, Cabré E, Gassull MA. *Effect of olive oil on early and late events of colon carcinogenesis in rats: modulation of arachidonic acid metabolism and local prostaglandin E(2) synthesis*. Gut. 2000 Feb;46(2):191-9.
63. Miguel Asensi, Angel Ortega, Salvador Mena, Fatima Feddi and José M. Estrela. *Natural polyphenols in cancer therapy*. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences, 2011; 1–20
64. Emily Waterman, MPharm, and Brian Lockwood, BPharm, PhD, MRPharmS. *Alternative Medicine Review* Volume 12, Number 4 2007
65. Lambert JD, Hong J, Yang GY, Liao J, Yang CS. *Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: Evidence from laboratory investigations*. Am J Clin Nutr 2005; 81:284S–291S.
66. Aggarwal BB, Shishodia S. *Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer*. Biochem Pharmacol 2006; 71:1397–1421.

67. Kang NJ, Shin SH, Lee HJ, Lee KW. *Polyphenols as small molecular inhibitors of signaling cascades in carcinogenesis*. *Pharmacol Ther* 2011; 130:310–324.
68. D'Incalci M, Steward WP, Gescher AJ. *Use of cancer chemopreventive phytochemicals as antineoplastic agents*. *Lancet Oncol* 2005; 6:899–904.
69. Kandaswami C, Kanadaswami C, Lee LT, Lee PP, Hwang JJ, Ke FC, Huang YT, Lee MT. *The antitumor activities of flavonoids*. *In Vivo* 2005; 19:895–909.
70. Pitot HC. *The natural history of neoplastic development: the relation of experimental models to human cancer*. *Cancer*. 1982 Mar 15;49(6):1206-11.
71. Cavenee WK, White RL. *The genetic basis of cancer*. *Sci Am* 1995; 272(3):72-79
72. Moreno S. *Comienzo de mitosis*. *Investig Cienc*, 1992;1 87:62-70
73. León J, Guerrero I, Pellicer A. *Activación de los oncogenes por radiación y agentes químicos*. *Investig Cienc* 1988; 143:20-34.
74. Iwasawa A, Nieminen P, Lehtinen M, Paavonen J. *Human papillomavirus DNA in uterine cervix squamous cell carcinoma and adenocarcinoma detected by polymerase chain reaction*. *Cancer* 1996; 77(11):2275-2279.
75. Teramoto N, Sarker AB, Tonoyama Y, Yoshino T, Hayashi K, Takahashi K, et al. *Epstein-Barr virus infection in the neoplastic and nonneoplastic cells of lymphoid malignancies*. *Cancer* 1996; 77(11):2339-2347.
76. Gallo R. *Virus oncogénicos ARN*. *Seminarios de Oncología* 126-148. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 1977.

77. Green M. *Virus ADN: replicación, expresión del gene tumoral y papel en el cáncer humano*. Seminarios de Oncología 103-125. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, 1977.
78. Iwasawa A, Nieminen P, Lehtinen M, Paavonen J. *Human papillomavirus DNA in uterine cervix squamous cell carcinoma and adenocarcinoma detected by polymerase chain reaction*. Cancer 1996; 77(11):2275-2279
79. Colville-Nash PR, Willoughby DA. *Growth factors in angiogenesis: current interest and therapeutic potential*. Mol Med Today 1997; 3(1):14-23.
80. Toi M, Kondo S, Suzuki H, Yamamoto Y, Inada K, Imazawa T, et al. *Quantitative analysis of vascular endothelial growth factor in primary breast cancer*. Cancer 1996; 77(6):1101-1106.
81. Maciag T. *Mecanismos moleculares y celulares de la angiogénesis*. En: De Vita V, ed. Avances en Oncología. España: Espaxs Publicaciones Médicas, 1990:109-127.
82. Liotta L. *Factores de motilidad autocrina tumoral*. En: De Vita V, ed. Avances en Oncología. España: Espaxs Publicaciones Médicas, 1988:33-49.
83. Halachmi S, Marden E, Martin G, MacKay H, Abbondanza C, Brown M. *Estrogen receptor-associated proteins: possible mediators of hormone-induced transcription*. Science 1994;264(5164):1455-1458.
84. Khan SA, Rogers MA, Obando JA, Tamsen A. *Estrogen receptor expression of benign breast epithelium and its association with breast cancer*. Cancer Res 1994; 54(4):993-997
85. Vogelstein B, Kinzler KW. *Cancer genes and pathways they control*. Nat Med 2004; 10(8):789-799.

86. Bardelli A, Velculescu VE. *Mutational analysis of gene families in human cancer.* Curr Opin Genet Dev 2005;15(1):5-12.
87. C. J. Sherr and J. M. Roberts, "CDK inhibitors: positive and negative regulators of G<sub>1</sub>-phase progression," Genes and Development, vol. 13, no. 12, pp. 1501–1512, 1999.
88. H. Funabiki, H. Yamano, K. Kumada, K. Nagao, T. Hunt, and M. Yanagida, "Cut2 proteolysis required for sister-chromatid separation in fission yeast," Nature, vol. 381, no. 6581, pp. 438–441, 1996.
89. Traganos F. *Cycling without cyclins.* Cell Cycle 2004, 3:32-34.
90. W. R. Sellers and W. G. Kaelin, "pRB as a modulator of transcription," Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1288, pp. M1–M5, 1996.
91. Ma T, Van Tine BA, Wei Y, Garrett MD, Nelson D, Adams PD, Wang J, Qin J, Chow LT, Harper JW: *Cell cycle-regulated phosphorylation of p220NPAT by cyclin E/Cdk2 in Cajal bodies promotes histone gene transcription.* Genes Dev 2000, 14:2298-2313.
92. H. Matsushime, M. E. Ewen, D. K. Strom et al., "Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34<sup>PSKJ3</sup>/cdk4) for mammalian D type G<sub>1</sub> cyclins," Cell, vol. 71, no. 2, pp. 323–334, 1992.
93. Suzuki K., Matsubara H. *Recent Advances in p53 Research and Cancer Treatment.* Journal of Biomedicine and Biotechnology Volume 2011
94. L. E. Giono and J. J. Manfredi, "The p53 tumor suppressor participates in multiple cell cycle checkpoints" Journal of Cellular Physiology, vol. 209, no. 1, pp. 13–20, 2006.

95. C. Cordon-Cardo, "Mutation of cell cycle regulators: biological and clinical implications for human neoplasia," *The American Journal of Pathology*, vol. 147, no. 3, pp. 545–560, 1995
96. J. Campisi and F. d'Adda di Fagagna, "Cellular senescence: when bad things happen to good cells," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 8, no. 9, pp. 729–740, 2007.
97. E. Yonish-Rouach, D. Resnitzky, J. Lotem, L. Sachs, A. Kimchi, and M. Oren, "Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6," *Nature*, vol. 352, no. 6333, pp. 345–347, 1991.
98. Rubbi C.P., Milner J. *p53Guardian of a Genome's Guardian?* *Cell Cycle* 2:1, 18-19, January/February 2003
99. Friedberg EC, Walker GC, Siede W. *DNA repair and mutagenesis*. Washington, DC: ASM Press, 1995.
100. Hanawalt PC. *Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation*. *Oncogene* 2002; 21:8949-56.
101. M. B. Kastan, O. Onyekwere, D. Sidransky, B. Vogelstein, and R. W. Craig, "Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage," *Cancer Research*, vol. 51, no. 23, pp. 6304–6311, 1991.
102. E. Reihsaus, M. Kohler, S. Kraiss, M. Oren, and M. Montenarh, "Regulation of the level of the oncoprotein p53 in nontransformed and transformed cells," *Oncogene*, vol. 5, no. 1, pp. 137–145, 1990
103. N. C. Reich and A. J. Levine, "Growth regulation of a cellular tumour antigen, p53, in nontransformed cells," *Nature*, vol. 308, no. 5955, pp. 199–201, 1984

104. J. W. Harper, G. R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi, and S. J. Elledge, “*The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases,*” *Cell*, vol. 75, no. 4, pp. 805–816, 1993.
105. C. X Deng, P. M. Zhang, J. W. Herper, S. J. Elledge, and P. Leder, “*Mice lacking p21(CIP1/WAF1) undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control,*” *Cell*, vol. 82, no. 4, pp. 675–684, 1995.
106. T. Miyashita, S. Krajewski, M. Krajewska et al., “*Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo,*” *Oncogene*, vol. 9, no. 6, pp. 1799–1805, 1994.
107. T. Miyashita and J. C. Reed, “*Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene,*” *Cell*, vol. 80, no. 2, pp. 293–299, 1995.
108. R. Brosh and V. Rotter, “*When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field,*” *Nature Reviews Cancer*, vol. 9, no. 10, pp. 701–713, 2009.
109. Mohan H: *Textbook of pathology. 5 edition.* New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers; 2010, 21-60.
110. Merkle CJ: *Cellular adaptation, injury, and death. In Pathophysiology: concepts of altered health states.* 8 edition. Edited by: Porth CM, Matfin G. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams and Wilkins; 2009:94-111
111. Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P, Zhivotovskiy B, Blagosklonny MV, Malorni W, Knight RA, Piacentini M, Nagata S, Melino G:

*Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death.* Cell Death Differ 2005, 12:1463-1467.

112. Manjo G, Joris I. *Apoptosis, oncosis, and necrosis.* An overview of cell death. Am J Pathol 1995, 146:3-15
113. Hengartner MO. *Apoptosis: corralling the corpses.* Cell 2000, 104:325-328
114. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. *Robins and Cotran: pathologic basis of disease.* 8 edition. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2010, 25-32
115. Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. *Caspases: pharmacological manipulation of cell death.* J Clin Invest 2005, 115:2665-267
116. O'Brien MA, Kirby R. *Apoptosis: a review of pro-apoptotic and antiapoptotic pathways and dysregulation in disease.* J Vet Emerg Crit Care 2008, 18(6):572-585.
117. Schneider P, Tschopp J. *Apoptosis induced by death receptors.* Pharm Acta Helv 2000, 74:281-286.
118. Karp G. *Cell and molecular biology: Concepts and experiments.* 5 edition. John New Jersey: Wiley and Sons; 2008, 653-657
119. Danial NN, Korsmeyer SJ. *Cell death: critical control points.* Cell 2004, 116(2):205-219
120. Reed JC. *Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in haematologic malignancies.* Semin Haematol 1997,34:9-1
121. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. *Mitochondrial membrane permeabilisation in cell death.* Physiol Rev 2007, 87(1):99-16

122. LaCasse EC, Mahoney DJ, Cheung HH, Plenchette S, Baird S, Korneluk RG: *IAP-targeted therapies for cancer*. *Oncogene* 2008, 27(48):6252-627
123. Szegezdi E, Fitzgerald U, Samali. *Caspase-12 and ER stress mediated apoptosis: the story so far*. *Ann NY Acad Sci* 2003, 1010:186-194.
124. Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. *Targeting apoptosis pathways in cancer therapy*. *CA Cancer J Clin* 2005, 55:178-194
125. Hanahan D, Weinberg RA. *The hallmarks of cancer*. *Cell* 2000, 100:57-70
126. Aeschbach R, Löliger J, Scott BC, Murcia A, Butler J, Halliwell B, Aruoma OI. *Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol*. *Food Chem Toxicol*. 1994 Jan; 32(1):31-6.
127. Fabiani R, Rosignoli P, De Bartolomeo A, Fuccelli R, Servili M, Montedoro GF, Morozzi G. *Oxidative DNA damage is prevented by extracts of olive oil, hydroxytyrosol, and other olive phenolic compounds in human blood mononuclear cells and HL60 cells*. *J Nutr*. 2008 Aug;138(8):1411-6
128. Nouis L, Doulias PT, Aligiannis N, Bazios D, Agalias A, Galaris D, Mitakou S *DNA protecting and genotoxic effects of olive oil related components in cells exposed to hydrogen peroxide*. *Free Radic Res*. 2005 Jul;39(7):787-95.
129. 130. Grasso, S., Siracusa, L., Spatafora, C., Renis, M., Tringali, C., 2007. *Hydroxytyrosol lipophilic analogues: enzymatic synthesis, radical scavenging activity and DNA oxidative damage protection*. *Bioorg. Chem*. 35, 137–152.
130. Ilavarasi K, Kiruthiga PV, Pandian SK, Devi KP. *Hydroxytyrosol, the phenolic compound of olive oil protects human PBMC against oxidative stress and DNA*

- damage mediated by 2,3,7,8-TCDD. *Chemosphere*. 2011 Aug;84(7):888-93. Epub 2011 Jul 7
131. Warleta F, Quesada CS, Campos M, Allouche Y, Beltrán G, Gaforio JJ. *Hydroxytyrosol Protects against Oxidative DNA Damage in Human Breast Cells*. *Nutrients*. 2011 Oct;3(10):839-57. Epub 2011 Oct 13.
132. Gill CI, Boyd A, McDermott E, McCann M, Servili M, Selvaggini R, Taticchi A, Esposito S, Montedoro G, McGlynn H, Rowland I. *Potential anti-cancer effects of virgin olive oil phenols on colorectal carcinogenesis models in vitro*. *Int J Cancer*. 2005 Oct 20;117(1):1-7.
133. Quiles JL, Farquharson AJ, Simpson DK, Grant I, Wahle KW. *Olive oil phenolics: effects on DNA oxidation and redox enzyme mRNA in prostate cells*. *Br J Nutr*. 2002 Sep;88(3):225-34; discussion 223-4.
134. Rafehi H, Smith AJ, Balcerczyk A, Ziemann M, Ooi J, Loveridge SJ, Baker EK, El-Osta A, Karagiannis TC. *Investigation into the biological properties of the olive polyphenol, hydroxytyrosol: mechanistic insights by genome-wide mRNA-Seq analysis*. *Genes Nutr*. 2011 Sep 28. [Epub ahead of print]
135. Oliveras-Ferraro C, Fernández-Arroyo S, Vazquez-Martin A, Lozano-Sánchez J, Cufí S, Joven J, Micol V, Fernández-Gutiérrez A, Segura-Carretero A, Menéndez JA. *Crude phenolic extracts from extra virgin olive oil circumvent de novo breast cancer resistance to HER1/HER2-targeting drugs by inducing GADD45-sensed cellular stress, G2/M arrest and hyperacetylation of Histone H3*. *Int J Oncol*. 2011 Jun;38(6):1533-47. doi: 10.3892/ijo.2011.993. Epub 2011 Mar 30.
136. Notarnicola M, Pisanti S, Tutino V, Bocale D, Rotelli MT, Gentile A, Memeo V, Bifulco M, Perri E, Caruso MG. *Effects of olive oil polyphenols on fatty acid synthase gene expression and activity in human colorectal cancer cells*. *Genes Nutr*. 2011 Feb;6(1):63-9. Epub 2010 May 16.

137. Corona G, Deiana M, Incani A, Vauzour D, Dessì MA, Spencer JP . *Hydroxytyrosol inhibits the proliferation of human colon adenocarcinoma cells through inhibition of ERK1/2 and cyclin D1*. Mol Nutr Food Res. 2009 Jul;53(7):897-903.
138. Fini L, Hotchkiss E, Fogliano V, Graziani G, Romano M, De Vol EB, Qin H, Selgrad M, Boland CR, Ricciardiello L. *Chemopreventive properties of pinoretinol-rich olive oil involve a selective activation of the ATM-p53 cascade in colon cancer cell lines*. Carcinogenesis. 2008 Jan;29(1):139-46. Epub 2007 Nov 13.
139. .
140. Fabiani R, De Bartolomeo A, Rosignoli P, Servili M, Montedoro GF, Morozzi G. *Cancer chemoprevention by hydroxytyrosol isolated from virgin olive oil through G1 cell cycle arrest and apoptosis*. Eur J Cancer Prev. 2002 Aug;11(4):351-8.
141. Fabiani R, De Bartolomeo A, Rosignoli P, Servili M, Selvaggini R, Montedoro GF, Di Saverio C, Morozzi G. *Virgin olive oil phenols inhibit proliferation of human promyelocytic leukemia cells (HL60) by inducing apoptosis and differentiation*. J Nutr. 2006 Mar;136(3):614-9.
142. Fabiani R, Rosignoli P, De Bartolomeo A, Fuccelli R, Morozzi G. *Inhibition of cell cycle progression by hydroxytyrosol is associated with upregulation of cyclin-dependent protein kinase inhibitors p21(WAF1/Cip1) and p27(Kip1) and with induction of differentiation in HL60 cells*. J Nutr. 2008 Jan;138(1):42-8.
143. Hashim YZ, Rowland IR, McGlynn H, Servili M, Selvaggini R, Taticchi A, Esposto S, Montedoro G, Kaisalo L, Wähälä K, Gill CI. *Inhibitory effects of olive oil phenolics on invasion in human colon adenocarcinoma cells in vitro*. Int J Cancer. 2008 Feb 1;122(3):495-500.

144. Granados-Principal S, Quiles JL, Ramirez-Tortosa CL, Sanchez- Rovira P, Ramirez-Tortosa MC (2010) *Hydroxytyrosol: from laboratory investigations to future clinical trials*. Nutr Rev 68(4):191–206.
145. Ilavarasi K, Kiruthiga PV, Pandian SK, Devi KP *Hydroxytyrosol, the phenolic compound of olive oil protects human PBMC against oxidative stress and DNA damage mediated by 2,3,7,8-TCDD*. Chemosphere. 2011 Aug;84(7):888-93. Epub 2011 Jul 7.
146. Zhang Y, Jiang L, Jiang L, Geng C, Li L, Shao J, Zhong L. *Possible involvement of oxidative stress in potassium bromate-induced genotoxicity in human HepG2 cells*. Chem Biol Interact. 2011 Feb 1;189(3):186-91. Epub 2010 Dec 21.
147. Liu Z, Sun L, Zhu L, Jia X, Li X, Jia H, Wang Y, Weber P, Long J, Liu J *Hydroxytyrosol protects retinal pigment epithelial cells from acrolein-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction*. J Neurochem. 2007 Dec;103(6):2690-700. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04954.x.
148. Guo W, An Y, Jiang L, Geng C, Zhong L. *The protective effects of hydroxytyrosol against UVB-induced DNA damage in HaCaT cells*. Phytother Res. 2010 Mar;24(3):352-9.
149. Zhang X, Jiang L, Geng C, Cao J, Zhong L. *The role of oxidative stress in deoxynivalenol-induced DNA damage in HepG2 cells*. Toxicol. 2009 Sep 15;54(4):513-8. Epub 2009 May 30.
150. Zhang X, Cao J, Jiang L, Geng C, Zhong L. *Protective effect of hydroxytyrosol against acrylamide-induced cytotoxicity and DNA damage in HepG2 cells*. Mutat Res. 2009 May 12;664(1-2):64-8. Epub 2009 Mar 10.

151. Zhang X, Jiang L, Geng C, Hu C, Yoshimura H, Zhong L. *Inhibition of Sudan I genotoxicity in human liver-derived HepG2 cells by the antioxidant hydroxytyrosol*. Free Radic Res. 2008 Feb;42(2):189-95.
152. Deiana M, Aruoma OI, Bianchi ML, Spencer JP, Kaur H, Halliwell B, Aeschbach R, Banni S, Dessi MA, Corongiu FP. *Inhibition of peroxynitrite dependent DNA base modification and tyrosine nitration by the extra virgin olive oil-derived antioxidant hydroxytyrosol*. Free Radic Biol Med. 1999 Mar;26(5-6):762-9
153. Loru D, Incani A, Deiana M, Corona G, Atzeri A, Melis MP, Rosa A, Dessi MA. *Protective effect of hydroxytyrosol and tyrosol against oxidative stress in kidney cells*. Toxicol Ind Health. 2009 May-Jun;25(4-5):301-10.
154. Zrelli H, Matsuoka M, Kitazaki S, Zarrouk M, Miyazaki H. *1 Hydroxytyrosol reduces intracellular reactive oxygen species levels in vascular endothelial cells by upregulating catalase expression through the AMPK-FOXO3a pathway*. Eur J Pharmacol. 2011 Jun 25;660(2-3):275-82. Epub 2011 Apr 12
155. Goya L, Mateos R, Bravo L. *Effect of the olive oil phenol hydroxytyrosol on human hepatoma HepG2 cells. Protection against oxidative stress induced by tertbutylhydroperoxide*. Eur J Nutr. 2007;46:70-78.
156. Deiana M, Corona G, Incani A, Loru D, Rosa A, Atzeri A, Paola Melis M, Assunta Dessi M. *Protective effect of simple phenols from extravirgin olive oil against lipid peroxidation in intestinal Caco-2 cells*. Food Chem Toxicol. 2010 Oct;48(10):3008-16. Epub 2010 Aug 4.
157. Deiana M, Incani A, Rosa A, Atzeri A, Loru D, Cabboi B, Paola Melis M, Lucas R, Morales JC, Assunta Dessi M. *Hydroxytyrosol glucuronides protect renal tubular epithelial cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced oxidative damage*. Chem Biol Interact. 2011 Sep 30;193(3):232-9. doi: 10.1016/j.cbi.2011.07.002. Epub 2011 Jul 21.

158. Zhang X, Cao J, Jiang L, Zhong L. *Suppressive effects of hydroxytyrosol on oxidative stress and nuclear Factor-kappaB activation in THP-1 cells.* Biol Pharm Bull. 2009 Apr;32(4):578-82.
159. González-Correa JA, Navas MD, Lopez-Villodres JA, Trujillo M, Espartero JL, De La Cruz JP *Neuroprotective effect of hydroxytyrosol and hydroxytyrosol acetate in rat brain slices subjected to hypoxia-reoxygenation.* Neurosci Lett. 2008 Dec 3;446(2-3):143-6.
160. Ragione FD, Cucciolla V, Borriello A, Pietra VD, Pontoni G, Racioppi L, Manna C, Galletti P, Zappia V. *Hydroxytyrosol, a natural molecule occurring in olive oil, induces cytochrome c-dependent apoptosis.* Biochem Biophys Res Commun. 2000 Nov 30;278(3):733-9.
161. Bouallagui Z, Han J, Isoda H, Sayadi S. *Hydroxytyrosol rich extract from olive leaves modulates cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells.* Food Chem Toxicol. 2011 Jan;49(1):179-84. Epub 2010 Oct 16
162. Han J, Talorete TP, Yamada P, Isoda H. *Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells.* Cytotechnology. 2009;59:45-53.
163. Guichard C, Pedruzzi E, Fay M, et al. *Dihydroxyphenylethanol induces apoptosis by activating serine/threonine protein phosphatase PP2A and promotes the endoplasmic reticulum stress response in human colon carcinoma cells.* Carcinogenesis. 2006;27:1812-1827
164. Corona G, Deiana M, Incani A, Vauzour D, Dessì MA, Spencer JP. *Inhibition of p38/CREB phosphorylation and COX-2 expression by olive oil polyphenols underlies their anti-proliferative effects.* Biochem Biophys Res Commun. 2007 Oct 26;362(3):606-11. Epub 2007 Aug 17.

165. D'Angelo S, Ingrosso D, Migliardi V, Sorrentino A, Donnarumma G, Baroni A, Masella L, Tufano MA, Zappia M, Galletti P. *Hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil, prevents protein damage induced by long-wave ultraviolet radiation in melanoma cells*. Free Radic Biol Med. 2005 Apr 1;38(7):908-19.
166. Pereira-Caro G, Sarriá B, Madrona A, Espartero JL, Goya L, Bravo L, Mateos R. *Alkyl hydroxytyrosyl ethers show protective effects against oxidative stress in HepG2 cells*. J Agric Food Chem. 2011 Jun 8;59(11):5964-76. Epub 2011 May 6.
167. Menendez, J.A., Vazquez-Martin, A., Colomer, R., Brunet, J., Carrasco-Pacombo, A., Garcia-Villalba, R., Fernandez-Gutierrez, A., Segua-Carretero, A. *Olive oil's bitter principle reverses acquired autoresistance to trastuzumab (Herceptin) in HER2-overexpressing breast cancer cells*. BMC Cancer 7, 80. 2007
168. Obied, H.K., Prenzler, P.D., Konczak, I., Rehman, A., Robards, K. (2009) *Chemistry and bioactivity of olive biophenols in some antioxidant and antiproliferative in vitro bioassay*. Chemical Research in Toxicology, 22, 227-234.
169. Fabiani, R., Fuccelli, R., Pieravanti, F., De Bartolomeo, A., Morozzi, G. *Production of hydrogen peroxide is responsible for the induction of apoptosis on HL60 cells*. Molecular Nutrition & Food Research, 2009; 53, 887-896.
170. Fabiani, R., Rosignoli, P., De Bartolomeo, A., Fuccelli, R., Servili, M., & Morozzi, G. *The production of hydrogen peroxide is not a common mechanism by which olive oil phenol compounds induce apoptosis on HL60 cells*. Food Chemistry, 2011; 125, 1249-1255.
171. Sergio Granados-Principal, José L Quiles, Cesar L Ramirez-Tortosa, Pedro Sanchez-Rovira, and M Carmen Ramirez-Tortosa. *Hydroxytyrosol: from laboratory investigations to future clinical trials Nutrition Reviews®* Vol. 68(4):191–206

172. Sachdeva, R.; Thomas, B.; Wang, X.; Ma, J.; Jones, K. H.; Hatcher, P. G.; Cornwell, D. G. *Tocopherol metabolism using thermochemolysis: chemical and biological properties of  $\gamma$ -tocopherol,  $\gamma$ -carboxyethyl-hydroxychroman, and their quinones.* Chem. Res. Toxicol. 2005, 18, 1018–1025.
173. Cornwell DG, Ma J. *Nutritional benefit of olive oil: the biological effects of hydroxytyrosol and its arylating quinone adducts.* J Agric Food Chem. 2008;56:8774–8786.
174. Cornwell, D. G.; Ma, J. *Studies in vitamin E: biochemistry and molecular biology of tocopherol quinones.* Vitam. Horm. 2007,76, 99–134.
175. Wang, X.; Thomas, B.; Sachdeva, R.; Arterburn, L.; Frye, L.; Hatcher, P. G.; Cornwell, D. G.; Ma, J. *Mechanism of arylating quinone toxicity involving Michael adduct formation and induction of endoplasmic reticulum stress.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2006, 103, 3604–3609
176. Coussens, L. M.; Werb, Z. *Inflammation and cancer.* Nature 2002,420, 860–867.
177. Greten, F. R.; Eckmann, L.; Greten, T. F.; Park, J. M.; Li, Z. W.; Egan, L. J.; Kagnoff, M. F.; Karin, M. *IKK links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer.* Cell 2004, 118, 285–296.
178. Pikarsky, E.; Porat, R. M.; Stein, I.; Abramovitch, R.; Amit, S.; Kasem, S.; Galkovych-Pyest, E.; Urieli-Shoval, S.; Galun, E.; Ben-Neriah, Y. *NF- $\kappa$ B functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer.* Nature 2004, 431, 461–466.
179. Huber, M. A.; Azoitei, N.; Baumann, B.; Grunert, S.; Sommer, A.; Pehamberger, H.; Kraut, N.; Beug, H.; Wirth, T. *NF- $\kappa$ B is essential for epithelial-mesenchymal*

- transition and metastasis in a model of breast cancer progression. J. Clin. Invest.* 2004, 114, 569–581
180. Sinha, P.; Clements, V. K.; Fulton, A. M.; Ostrand-Rosenberg, S. *Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells.* *Cancer Res.* 2007, 67, 4507–4513.
181. Bunt, S. K.; Yang, L.; Sinha, P.; Clements, V. K.; Leips, J.; Ostrand-Rosenberg, S. *Reduced inflammation in the tumor microenvironment delays the accumulation of myeloid-derived suppressor cells and limits tumor progression.* *Cancer Res.* 2007, 67, 10019–10026. 186.
182. Battin, E.B.; Brumaghim, J.L. (2009) *Antioxidant activity of sulfur and selenium: A review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase, and metal binding antioxidant mechanisms.* *Cell Biochem. Biophys.*, 55, 1-23.
183. Nagini, S. *Cancer chemoprevention by garlic and its organosulfur compounds-panacea or promise?* *Anti-Canc. Agents Med. Chem.*, 2008, 313-321.
184. El-Bayoumy K, Sinha R, Pinto JT, Rivlin RS. *Cancer chemoprevention by garlic and garlic-containing sulfur and selenium compounds.* *J Nutr.* 2006; 136(3 Suppl):864S–869
185. Milner JA. *Preclinical perspectives on garlic and cancer.* *J Nutr.* 2006; 136(3 Suppl):827S–831
186. Myzak MC, Karplus PA, Chung FL, Dashwood RH. *A novel mechanism of chemoprotection by sulforaphane: inhibition of histone deacetylase.* *Cancer Res.* 2004; 64(16):5767–5777

187. Chen YX, Fang JY, Lu R, Qiu DK. *Expression of p21(WAF1) is related to acetylation of histone H3 in total chromatin in human colorectal cancer*. World J Gastroenterol. 2007
188. Fimognari C, Nusse M, Cesari R, Iori R, Cantelli-Forti G, Hrelia P. *Growth inhibition, cell-cycle arrest and apoptosis in human T-cell leukemia by the isothiocyanate sulforaphane*. Carcinogenesis. 2002;23(4):581–586.
189. Gamet-Payrastre L, Li P, Lumeau S, Cassar G, Dupont MA, Chevolleau S, Gasc N, Tulliez J, Terce F. *Sulforaphane, a naturally occurring isothiocyanate, induces cell cycle arrest and apoptosis in HT29 human colon cancer cells*. Cancer Res. 2000; 60(5):1426–1433
190. Parnaud G, Li P, Cassar G, Rouimi P, Tulliez J, Combaret L, Gamet-Payrastre L. *Mechanism of sulforaphane-induced cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells*. Nutr Cancer. 2004; 48(2):198–206
191. Shen G, Xu C, Chen C, Hebbar V, Kong AN. *p53-independent G1 cell cycle arrest of human colon carcinoma cells HT-29 by sulforaphane is associated with induction of p21CIP1 and inhibition of expression of cyclin D1*. Cancer Chemother Pharmacol. 2006; 57(3):317–327
192. Singh SV, Herman-Antosiewicz A, Singh AV, Lew KL, Srivastava SK, Kamath R, Brown KD, Zhang L, Baskaran R. *Sulforaphane-induced G2/M phase cell cycle arrest involves checkpoint kinase 2-mediated phosphorylation of cell division cycle 25C*. J Biol Chem. 2004; 279(24):25813–25822
193. Wallace, R. A.; Wallace, L.; Harrold, M.; Miller, D.; Uretsky, N. (1989) *Interaction of permanently charged chlorpromazine and dopamine analogs with the striatal D-1 dopaminergic receptor*. Biochem. Pharmacol., 38, 2019-2025.

194. Hosegawa, Y.; Shinto, S.; Hattori, T.; Ohata, T.; Aga, A.; Bae, H.-R.; Yan, K. Jpn. Kokai Tokkyo Koho 1998, JP 10.273.464. A 1998.1013.
195. Takeuchi, T.; Murase, N.; Maki, H.; Mukawa, T.; Shinmori, H. (2006) *Dopamine selective molecularly imprinted polymers via post-imprinting modification*. Org. Biomol. Chem., 4, 565-568.
196. Saleem M, Kim HJ, Ali MS, Lee YS. *An update on bioactive plant lignans*. Nat Prod Rep 2005;22:696-716.
197. Peterson J, Dwyer J, Adlercreutz H, Scalbert A, Jacques P, McCullough ML. *Dietary lignans: physiology and potential for cardiovascular disease risk reduction*. Nutr Rev 2010;68:571-603.
198. Nurmi T, Mursu J, Peñalvo JL, Poulsen HE, Voutilainen S. *Dietary intake and urinary excretion of lignans in Finnish men*. Br J Nutr 2010;103:677-85.
199. Sok DE, Cui HS, Kim MR. *Isolation and bioactivities of furfuran type lignan compounds from edible plants*. Recent Pat Food Nutr Agric 2009;1:87-95
200. Touillaud M.S., Thiebaut A.C., Fournier A., Niravong M., Boutron-Ruault M.C., Clavel-Chapelon F. *Dietary lignan intake and postmenopausal breast cancer risk by estrogen and progesterone receptor status* J. Natl. Cancer Inst. 2007,Marzo, 21; 99 (6), 475-86.
201. Saarinen NM, Huovinen R, Wärrä A, Mäkelä SI, Valentín-Blasini L, Sjöholm R, Ammälä J, Lehtilä R, Eckerman C, Collan YU, Santti RS. *Enterolactone inhibits the growth of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary carcinomas in the rat*. Mol Cancer Ther. 2002 Aug;1(10):869-76.

202. Mousavi Y, Adlercreutz H. *Genistein is an effective stimulator of sex hormone-binding globulin production in hepatocarcinoma human liver cancer cells and suppresses proliferation of these cells in culture*. Steroids. 1993 Jul;58(7):301-4.
203. S Sung MK, Lautens M, Thompson LU *Mammalian lignans inhibit the growth of estrogen-independent human colon tumor cells*. Anticancer Res. 1998 May-Jun;18(3A):1405-8.
204. Saleem M, Kim HJ, Ali MS, Lee YS. *An update on bioactive plant lignans*. Nat Prod Rep 2005;22:696-716.
205. Huang DM, Guh JH, Chueh SC, Teng CM. *Modulation of anti-adhesion molecule MUC-1 is associated with arctiin-induced growth inhibition in PC-3 cells*. Prostate 2004;59:260-7.
206. Yoo JH, Lee HJ, Kang K, Jho EH, Kim CY, Baturen D, et al. *Lignans inhibit cell growth via regulation of Wnt/beta-catenin signaling*. Food Chem Toxicol 2010; 48:2247-52.
207. Peuhu E, Rivero-Müller A, Stykki H, Torvaldson E, Holmbom T, Eklund P, et al. *Inhibition of Akt signaling by the lignan matairesinol sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis*. Oncogene 2010;29:898-908.
208. Bylund A, Saarinen N, Zhang JX, Bergh A, Widmark A, Johansson A, et al. *Anticancer effects of a plant lignan 7-hydroxymatairesinol on a prostate cancer model in vivo*. Exp Biol Med 2005;230:217-23.
209. Yokota T, Matsuzaki Y, Koyama M, Hitomi T, Kawanaka M, Enoki-Konishi M, et al. *Sesamin, a lignan of sesame, down-regulates cyclin D1 protein expression in human tumor cells*. Cancer Sci 2007;98:1447-53.

210. J. H. Kim, Y. H. Park, S. W. Choi, E. K. Yang and W. J. Lee, *Nutraceuticals Food*, 2003, 8, 211-113.
212. B.-Y. Park, B.-S. Min, O.-K. Kwon, S.-R. Oh, K.-S. Ahn, T.-J. Kim, D.-Y. Kim, K. W. Bae and H.-K. Lee, *Biol. Pharm. Bull.*, 2004, 27, 1305.
213. G. Li, C.-S. Lee, M.-H. Woo, S.-H. Lee, H.-W. Chang and J.-K. Son, *Biol. Pharm. Bull.*, 2004, 27, 1147.
214. Adlercreutz E. *Lignans and human health*. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2007;44:483-525.
215. Kim HY, Kim JK, Choi JH, Jung JY, Oh WY, Kim DC, et al. *Hepatoprotective effect of pinoresinol on carbon tetrachloride-induced hepatic damage in mice*. *J Pharmacol Sci* 2010;112:105-12.
216. Kuo PC, Lin MC, Chen GF, Yiu TJ, Tzen JT. *Identification of methanol-soluble compounds in sesame and evaluation of antioxidant potential of its lignans*. *J Agric Food Chem* 2011; 59:3214-9.
217. Jung HM, Mahesh R, Lee JG, Lee SH, Kim YS, Park YK. *Pinoresinol from the fruits of Forsythia koreana inhibits inflammatory responses in LPS-activated microglia*. *Neurosci Lett* 2010; 480:215-20.
218. Kwak JH, Kang MW, Roh JH, Choi SU, Zee OP. *Cytotoxic phenolic compounds from Chionanthus retusus*. *Arch Pharm Res* 2009;32:1681

219. Moon SS, Rahman AA, Kim JY, Kee SH. *Hanultarin, a cytotoxic lignin as an inhibitor of actin cytoskeleton polymerization from the seeds of Trichosanthes kirilowii*. *Bioorg Med Chem* 2008;16:7246-9
220. Fini L, Hitchkiss E, Fogliano V, Graziani G, Romano M, De Vol EB, et al. *Chemopreventive properties of pinoresinol-rich olive oil involves a selective activation of the ATM-p53 cascade in colon cancer cell lines*. *Carcinogenesis* 2008;29:139-46.
221. Lozano-Sánchez J, Segura-Carretero A, Menendez JA, Oliveras-Ferraro C, Cerretani L, Fernández-Gutiérrez A. *Prediction of extra virgin olive oil varieties through their phenolic profile. Potential cytotoxic activity against human breast cancer cells*. *J Agric Food Chem* 2010;58:9942-55.
222. Longley DB and Johnston PG *Molecular mechanisms of drug resistance J Pathol* 2005; 205: 275–292
223. Shukla S, Wu CP, Ambudkar SV. *Development of inhibitors of ATP-binding cassette drug transporters: present status and challenges*. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2008 Feb;4(2):205-23.
224. Kelley MR, Fishel ML. *DNA repair proteins as molecular targets for cancer therapeutics*. *Anticancer Agents Med Chem*. 2008 May;8(4):417-25. Review.
225. Mashima T, Tsuruo T. *Defects of the apoptotic pathway as therapeutic target against cancer*. *Drug Resist Updat*. 2005 Dec;8(6):339-43.. Review.
226. Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM. *Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1999;39:361-98. Review

227. Stavrovskaya AA. *Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells*. Biochemistry (Mosc). 2000 Jan;65(1):95-106. Review.
228. Gillet JP, Efferth T, Remacle J. *Chemotherapy-induced resistance by ATP-binding cassette transporter genes*. Biochim Biophys Acta. 2007; 1775:237–262.
229. Szakacs G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM. *Targeting multidrug resistance in cancer*. Nat Rev Drug Discov. 2006; 5:219–234.
230. Aye IL, Singh AT, Keelan JA. *Transport of lipids by ABC proteins: interactions and implications for cellular toxicity, viability and function*. Chem Biol Interact. 2009; 180:327–339.
231. Riordan JR. *CFTR function and prospects for therapy*. Annu Rev Biochem. 2008; 77:701–726.
232. Zutz A, Gompf S, Schagger H, Tampe R. *Mitochondrial ABC proteins in health and disease*. Biochim Biophys Acta. 2009; 1787:681–690.
233. Scholz C, Tampe R. *The peptide-loading complex--antigen translocation and MHC class I loading*. Biol Chem. 2009; 390:783–794.
234. Miller DS, Bauer B, Hartz AM. *Modulation of P-glycoprotein at the blood-brain barrier: opportunities to improve central nervous system pharmacotherapy*. Pharmacol Rev. 2008; 60:196–209.
235. Leslie EM, Deeley RG, Cole SP. *Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense*. Toxicol Appl Pharmacol. 2005; 204:216–237.

236. van de Water FM, Masereeuw R, Russel FG. *Function and regulation of multidrug resistance proteins (MRPs) in the renal elimination of organic anions.* Drug Metab Rev. 2005; 37:443–471.
237. Launay-Vacher V, Izzedine H, Karie S, Hulot JS, Baumelou A, Deray G. *Renal tubular drug transporters.* Nephron Physiol. 2006; 103:97–106.
238. Gillet, JP.; Okabe, M.; Gottesman, MM. *The Hepatocyte and the Cancer Cell: Dr. Jekyll and Mr. Hyde.* In: Arias, IM.; Fausto, N.; Boyer, JL.; Chisari, FV.; Shafritz, DA., editors. *The liver: Biology and Pathobiology.* 5. Oxford: Wiley-Blackwell; 2009. p. 1075-1090.
239. Oostendorp RL, Beijnen JH, Schellens JH. *The biological and clinical role of drug transporters at the intestinal barrier.* Cancer Treat Rev. 2009; 35:137–147.
240. Higgins CF. *Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters.* Nature. 2007 Apr 12;446(7137):749-57. Review.
241. Neyfakh AA. *Mystery of multidrug transporters: the answer can be simple.* Mol Microbiol. 2002 Jun;44(5):1123-30. Review.
242. Sarkadi B, Homolya L, Szakács G, Váradi A *Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system.* Physiol Rev. 2006 Oct;86(4):1179-236
243. Stavrovskaya and T. P. Stromskaya *Transport Proteins of the ABC Family and Multidrug Resistance of Tumor Cells A. Biochemistry (Moscow), 2008, Vol. 73, No. 5, pp. 592-604*
244. Stromskaya, T., Rybalkina, E., Shtil, A., Zabolina, T., Filippova, N., and Stavrovskaya, A. (1998) *Brit. J. Cancer*, 77, 1718-1725.

245. Roninson IB, Chin JE, Choi KG, Gros P, Housman DE, Fojo A, Shen DW, Gottesman MM, Pastan I. *Isolation of human mdr DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1986 Jun;83(12):4538-42.
246. Stromskaya, T., Rybalkina, E., Zabolina, T., Shishkin, A., and Stavrovskaya, A. (2005) *Cancer Cell. Int.*, 24, 5-15
247. Kakpakova, E. S., Ktitorova, O. V., Rybalkina, E. Yu., Mechetner, E. B., and Stavrovskaya, A. A. (2004) *Biol. Membr. (Moscow)*, 21, 458-465.
248. Miltenberger, R. J., Farnham, P. J., Smith, D. E., Stommel, J. M., and Cornwell, M. M. (1995) *Cell Growth Differ.*, 6, 549-556.
249. Kim, S. H., Lee, S. H., Kwak, N. H., Kang, C. D., and Chung, B. S. (1996) *Cancer Lett.*, 98, 199-205
250. Dean M. *The genetics of ATP-binding cassette transporters. Methods Enzymol.* 2005; 400:409– 429
251. Simon, S. M., and Schindler, M. Dean M. *The genetics of ATP-binding cassette transporters. Methods Enzymol.* 2005; 400:409– 429.
252. Goldstein, L. G. (1997) *Eur. J. Cancer*, 32A, 1039-1050
253. Marie, J.-P., Zhou, D.-C., Gurbuxani, S., Legrand, O., and Zittoun, R. (1996) *Eur. J. Cancer*, 32A, 1034-1038.
254. Sandor, V., Fojo, T., and Bates, S. E. (1998) *Drug Res. Updates*, 1, 190-200.

255. Mohd Fahad Ullah. *Cancer Multidrug Resistance (MDR): A Major Impediment to Effective Chemotherapy* Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, Vol 9, 2008
- A. A. Stavrovskaya *Cellular Mechanisms of Multidrug Resistance of Tumor Cells Biochemistry* (Moscow), Translated from Biokhimiya, Vol. 65, No. 1, 2000, pp. 112-126
256. Beck, W. T., Cirtain, M. C., Look, A. T., and Ashmun, R. A. (1986) *Cancer Res.*, 46, 778-784.
257. Limtrakul P, Siwanon S, Yodkeeree S, et al. *Effect of Stemona curtisii root extract on P-glycoprotein and MRP-1 function in multidrug-resistant cancer cells.* *Phytomedicine*, 2007;14, 381–9.
258. Fong WF, Wang C, Zhu GY, et al (2007). *Reversal of multidrug resistance in cancer cells by Rhizoma Alismatis extract.* *Phytomedicine*, 14, 160–5.
259. Ling Li, Qiangrong Pan, Meng Sun, et al (2007). *Dibenzocyclooctadiene lignans – A class of novel inhibitors of multidrug resistance-associated protein.* *Life Sciences*, 80,741–8.
260. Feng Q, Dongzhi W, Qiang Z, et al. *Modulation of Pglycoprotein function and reversal of multidrug resistance by (-)-epigallocatechin gallate in human cancer cells.* *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2005;59, 64–9.
261. Byeong H Ch, Chang G K, Yoongho L, et al (2008). *Curcumin down-regulates the multidrug-resistance mdr1b gene by inhibiting the PI3K/Akt/NFjB pathway.* *Cancer Letters*, 259,111–8.

262. Conseil G, Baubichon-Cortay H, Dayan G, et al (1998). *Flavonoids: a class of modulators with bifunctional interactions at vicinal ATP- and steroid-binding sites on mouse P-glycoprotein*. Proc Natl Acad Sci USA, 95, 9831- 6.
263. Chung SY, Sung MK, Kim NH, et al (2005). *Inhibition of Pglycoprotein by natural products in human breast cancer cells*. Arch Pharm Res, 28, 823-8.
264. Mohd Fahad Ullah *Cancer Multidrug Resistance (MDR): A Major Impediment to Effective Chemotherapy Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, Vol 9, 2008*
265. Hussain RF, Nouri AM, Oliver RT. *A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay*. J Immunol Methods 1993;160:89-96.
266. Hoorens, A.; Van de Castele, M.; Kl€oppel, G.; Pipeleers, D. *Glucose promotes survival of rat pancreatic beta cells by activating synthesis of proteins which suppress a constitutive apoptotic program*. J. Clin. Invest. 1996, 98, 1568–1574.
267. Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmadi J, Wolff SP (1994) *Measurement of plasma hydroperoxide concentration by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine*. Anal Biochem 220:403–409
268. Olga Teufelhofer, Rosa-Maria Weiss, Wolfram Parzefall, Rolf Schulte-Hermann, Michael Micksche, Walter Berger, and Leonilla Elbling,. *Promyelocytic HL60 Cells Express NADPH Oxidase and Are Excellent Targets in a Rapid Spectrophotometric Microplate Assay for Extracellular Superoxide*. 2008Journal of Leukocyte Biology Volume 84
269. Kazuhiro Omori, Taisuke Ohira, Yushi Uchida, Srinivas Ayilavarapu, Eraldo L. Batista Jr., Motohiko Yagi, Tomoyuki Iwata, Hongsheng Liu, Hatice Hasturk,

- Alpdogan Kantarci, and Thomas E. Van Dyke,. *Priming of neutrophil oxidative burst in diabetes requires preassembly of the NADPH oxidase*. 2008 *Journal of Leukocyte Biology* Volume 84.
270. Huarong Tang, Fangping Chen, Qian Tan, Sanqin Tan, Linxin Liu, and Fan Zhang, *Regulation of CD11b transcription by decreasing PRC2 and increased acH4 level during ATRA-induced HL-60 differentiation*. 2009. *Acta Biochim Biophys Sin* 588–593
271. G.D. Birnie, 1988, *The HL60 cell line: A model system for studying human myeloid cell Differentiation*. *Br. J. Cancer*, 58, Suppl. IX, 41-45
272. Huarong Tang, Fangping Chen, Qian Tan, Sanqin Tan, Linxin Liu, and Fan Zhang, *Regulation of CD11b transcription by decreasing PRC2 and increased acH4 level during ATRA-induced HL-60 differentiation*. 2009. *Acta Biochim Biophys Sin* 588–593
273. Liochev SI, Fridovich I. *The effects of superoxide dismutase on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation*. 2007 *Free Rad Biol Med* 42:1465–1469
274. Long LH, Kirkland D, Whitwell J, Halliwell B. *Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the cell culture medium*. 2007 *Mutat Res* 634:177–183
275. Mochizuki M, Yamazaki S, Kano K, Ikeda T. *Kinetic analysis and mechanistic aspects of autoxidation of catechins*. *Biochim Biophys Acta* 2002 1569:35–44
276. Nakagawa H, Hasumi K, Woo JT, Nagai K, Wachi M. *Generation of hydrogen peroxide primarily contributes to the induction of Fe(II)-dependent apoptosis in Jurkat cells by(-)-epigallocatechin gallate*. 2004 *Carcinogenesis* 29:1567–1574

277. Miura YH, Tomita I, Watanabe T, Hirayama T, Fuku S (1998) *Active oxygen generation by flavonoids*. Biol Pharm Bull 21:93–96
278. Schuck AG, Ausubel MB, Zuckerbraun HL, Babich H *Theaflavin-3, 30-digallate, a component of black tea: an induced of oxidative stress and apoptosis*. 2008Toxicol In Vitro 22:598–609
279. Foreman BD, Tarloff JB *Contribution of reactive oxygen species to para-aminophenol toxicity in LLC-PK1 cells*. Toxicol Appl Pharmacol 2008230:144–149
280. Rietjens SJ, Bast A, Haenen GR. *New insights into controversies on the antioxidant potential of the olive oil antioxidant hydroxytyrosol*. J Agric Food Chem 200755:7609–7614
281. Visioli F, Bellomo G, Galli C. *Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols*. Biochem Biophys Res Comm 1998247:64
282. Liang Liu, Joel B. Berletch, Jessica G. Green, Mitchell S. Pate, Lucy G. Andrews, and Trygve O. Tollefsbol, 2004. *Telomerase inhibition by retinoids precedes cytodifferentiation of leukemia cells and may contribute to terminal differentiation*. Mol Cancer Ther; 3(8).
283. Sarah L. White , Larissa Belov , Nicole Barber , Philip D. Hodgkin ,Richard I. Christopherson,. *Immunophenotypic changes induced on human HL60 leukaemia cells by 1\_,25-dihydroxyvitamin D3 and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate*. Leukemia Research 200529 1141–1151
284. Yingyu Zhang, Jing Zhang George P. Studzinski,. *AKT Pathway Is Activated by 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 and Participates In Its Anti-Apoptotic Effect and Cell Cycle Control in Differentiating HL60 Cells*. Cell Cycle 2006; 5:4, 447-451, 16

285. Ewa Marcinkowska, Edward Garayb, Elzbieta Goceka, Agnieszka Chrobak, Xuening Wang, and George P. Studzinski, *Regulation of C/EBP $\beta$  isoforms by MAPK pathways in HL60 cells induced to differentiate by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. Exp Cell Res.* 2006;1; 312(11): 2054
286. Miaoqing Shen Andrew Yen, *Nicotinamide Cooperates with Retinoic Acid and 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> to Regulate Cell Differentiation and Cell Cycle Arrest of Human Myeloblastic Leukemia Cells.* Oncology; 2009;76:91–100
287. Guerrini A, Lampronti I, Bianchi N, Zuccato C, Breveglieri G, Salvatori F, et al. *Bergamot (Citrus bergamia Risso) fruit extracts as  $\gamma$ -globin gene expression inducers: phytochemical and functional perspectives.* J Agric Food Chem 2009;57:4103-11.
288. Huarong Tang, Fangping Chen, Qian Tan, Sanqin Tan, Linxin Liu, and Fan Zhang, 2009. *Regulation of CD11b transcription by decreasing PRC2 and increased acH4 level during ATRA-induced HL-60 differentiation.* Acta Biochim Biophys Sin 588–593
289. Yuki Ishii, Shingo Sakai, Yoshio Honma, *Pyridinyl imidazole inhibitor SB203580 activates p44/42 mitogen-activated protein kinase and induces the differentiation of human myeloid leukemia cells.* Leukemia Research, 2001; 25, 813–820
290. Xuening Wang and George P. Studzinski, *Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinases (ERKs) Defines the First Phase of 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-Induced Differentiation of HL60 Cells.* Journal of Cellular Biochemistry 2001;80:471±482

291. Xuening Wang and George P. Studzinski,. *Activation Phosphorylation of Raf-1 by Kinase Suppressor of Ras Is Inhibited by “MEK-Specific” Inhibitors PD 098059 and U0126 in Differentiating HL60 Cells.* 2001;Cell Research 268, 294–300
292. Azrak RG, Cao S, Durrani FA, Toth K, Bhattacharya A, Rustum YM. *Augmented therapeutic efficacy of irinotecan is associated with enhanced drug accumulation.* Cancer Lett. 2011 Dec 8;311(2):219-29. Epub 2011 Aug 6
293. Lavelle F, Bissery MC, André S, Roquet F, Riou JF. *Preclinical evaluation of CPT-11 and its active metabolite SN-38.*Semin Oncol. 1996 Feb; 23(1 Suppl 3):11-20. Review.
294. Rivory LP, Bowles MR, Robert J, Pond SM. *Conversion of irinotecan (CPT-11) to its active metabolite, 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38), by human liver carboxylesterase.* Biochem Pharmacol. 1996 Oct 11;52(7):1103-11.
295. Xu G, Zhang W, Ma MK, McLeod HL. *Human carboxylesterase 2 is commonly expressed in tumor tissue and is correlated with activation of irinotecan.* Clin Cancer Res. 2002 Aug;8(8):2605-11.
296. Luo HY, Wang ZQ, Wang FH, Qiu MZ, Teng KY, Ruan DY, He YJ, Li YH, Xu RH. *Phase 2 Study of Capecitabine and Irinotecan Combination Chemotherapy (Modified XELIRI Regimen) in Patients With Advanced Gastric Cancer.* Am J Clin Oncol. 2011 Dec;34(6):555-60.
297. Mitchell EP, Piperdi B, Lacouture ME, Shearer H, Iannotti N, Pillai MV, Xu F, Yassine M. *The Efficacy and Safety of Panitumumab Administered Concomitantly With FOLFIRI or Irinotecan in Second-Line Therapy for Metastatic Colorectal Cancer: The Secondary Analysis From STEPP (Skin Toxicity Evaluation Protocol With Panitumumab) by KRAS Status.* Clin Colorectal Cancer. 2011 Dec;10(4):333-9. Epub 2011 Oct 14.

298. Cancer susceptibility in the mouse: genetics, biology and implications for human cancer. Demant P. *Nat Rev Genet.* 2003 Sep;4(9):721-34. Review.