

VALUTAZIONE DI MARKERS DI INFIAMMAZIONE TRAMITE LIPIDOMICA ERITROCITARIA NELLA POPOLAZIONE ONCOLOGICA

Dr Michele Spina, biochimico, PhD

Dr Antonio Fusco, medico chirurgo, cardiologo

Dr.ssa Edy Virgili, biologa nutrizionista

Dr Massimiliano Cuccioloni, PhD Università di Camerino

Stato dell'arte

Le principali organizzazioni internazionali operanti nel settore della nutrizione affermano che le diete ad elevato contenuto in proteine e grassi animali possono provocare un *inflammaging* cellulare (la connessione tra i processi associati all'invecchiamento e l'inflammation cronica a bassa intensità), con conseguente aumento dei livelli di acido arachidonico (AA) e relativi metaboliti.

È ormai ampiamente accertato che l'inflammation cronica inadeguatamente trattata può aumentare il rischio del cancro. Tale condizione patologica è caratterizzata dal rilascio locale o sistemico di una serie di mediatori immunitari che possono favorire la genesi, la progressione e la aggressività tumorale, attraverso la stimolazione della proliferazione cellulare.

Dati recenti riguardanti la relazione tra il metabolismo dell'AA e la cancerogenesi, hanno identificato nuovi potenziali target molecolari nel trattamento del cancro. Il coinvolgimento della cicloossigenasi 2 (COX-2) e di uno dei suoi principali metaboliti, la prostaglandina E2 (PGE2), nella cancerogenesi del colon è ampiamente documentato. Tale enzima è infatti iper-espresso nelle cellule tumorali coliche. Numerosi studi indicano come la PGE2 possa aumentare la proliferazione, la mobilità ed il potenziale metastatico delle cellule tumorali, promuovere la neoangiogenesi tumorale, indurre immunosoppressione locale, ed inibire l'apoptosi.

Studi recenti forniscono ulteriori evidenze della compartecipazione della 5-LOX e dei suoi prodotti, l'acido 5(S)-idrossi-6E,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoico (5-S-HETE) e il leucotriene (LT)-B4, nello sviluppo e nella progressione di molti tumori umani, incluso quello al colon.

La cascata dell'AA è schematicamente visualizzata in figura 1: la presenza di elevati livelli di AA nella membrana eritrocitaria è rappresentativo della tendenza pro-infiammatoria, in quanto verrà rilasciato come segnalatore cellulare e precursore

delle prostaglandine E2, leucotrieni e prodotti di degradazioni del citocromo P450 4 (CYP4).

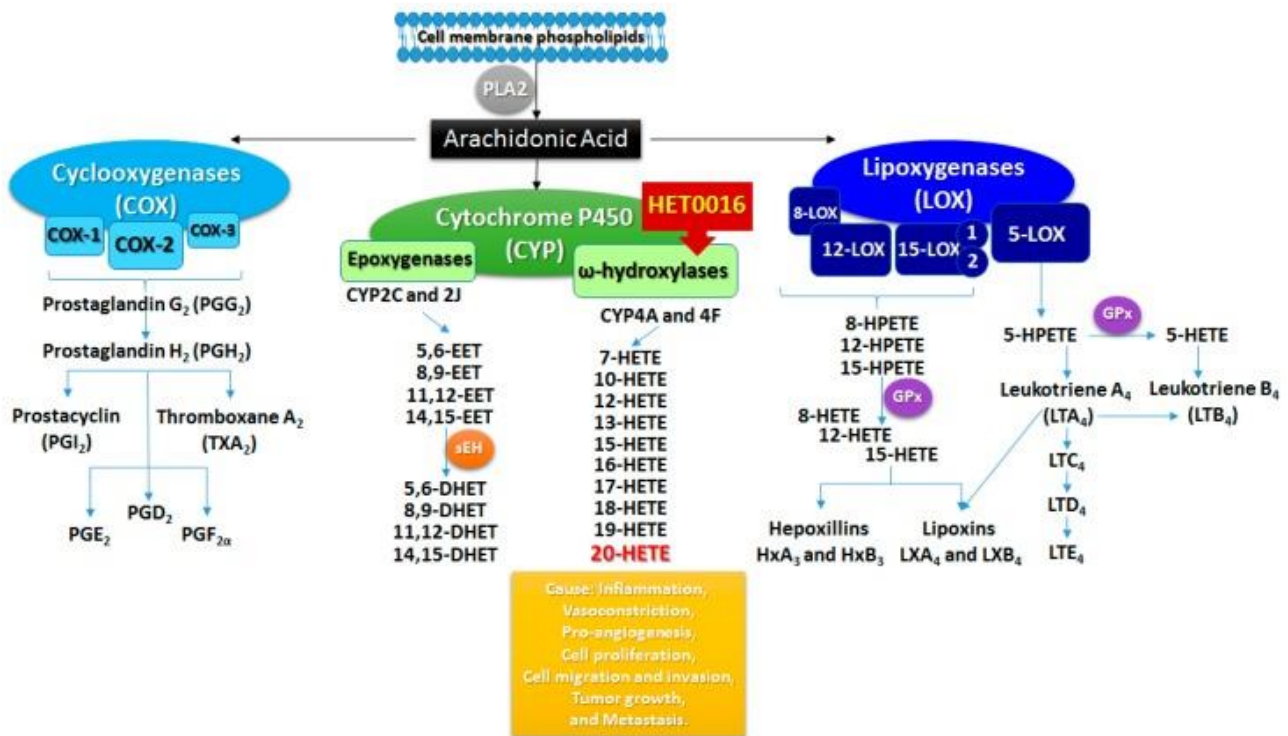


Figure 1. Schematic representation of phospholipid-arachidonic acid metabolites produced via the major enzymes cyclooxygenase (COX), lipoxygenase (LOX), and cytochrome P450 (CYP4A). CYP4A produced 20-hydroxy-eicosatetraenoic acids (20-HETE) metabolite, which is known to promote tumor growth. Legend: phospholipase A2 (PLA2); epoxy-eicosatrienoic acids—(EETs); epoxide hydrolase (sEH); dihydroxy-eicosatrienoic acids (DHETs); hydroperoxy-eicosatetraenoic acid (HPETE); glutathione peroxidase (GPx).

Di recente i ricercatori del Georgia Cancer Center hanno evidenziato il ruolo dell'acido 20-eicosatetraenoico (20-HETE, uno dei metaboliti dell'AA) quale eicosanoide di segnale coinvolto nell'angiogenesi e metastatizzazione del cancro, indicandone il relativo meccanismo di azione: il metabolita attiva una proteina chinasi, mediatori pro-infiammatori, ed altri fattori di crescita che promuovono la crescita, la proliferazione e la differenziazione cellulare. Il 20-HETE inoltre è un segnalatore pro-infiammatorio, in grado di attivare il fattore di necrosi tumorale e diverse interleuchine [1].

Dalle numerose ricerche degli ultimi anni e dagli studi ancora in corso sul tema del delicato rapporto tra alimentazione e cancro si evince che oltre un terzo delle neoplasie sono potenzialmente prevenibili con modifiche sostenibili dell'alimentazione. In dettaglio, una dieta "paleo", con elevato consumo di carne rossa, è considerata un fattore di stimolo alla proliferazione tumorale, accompagnata da un aumento di AA e dei relativi metaboliti pro-infiammatori. Per stabilire

univocamente se un regime alimentare ricco in grassi sia responsabile di un aumento dell'incidenza di determinati tipi di tumori o della relativa mortalità, sarebbero necessari dei trial interventistici, adeguatamente potenti, randomizzati e controllati. Ad oggi, nessuna analisi di questo tipo è stata ancora effettuata [2] e nessuno studio di coorte o caso-controllo è riuscito a mettere luce sulla questione. Pertanto, la relazione tra lipidi alimentari e cancro nelle popolazioni umane resta ampiamente irrisolta.

Le nuove strategie nutrizionali nella prevenzione oncologica convergono nella diminuzione sia del rapporto omega-6/omega-3 [3-5] e AA/EPA [6], in un quadro di risoluzione dell'infiammazione cronica, dei livelli di AA e dei suoi metaboliti ad azione proliferativa.

Lipidomica eritrocitaria

La lipidomica di membrana analizza la composizione in acidi grassi della membrana degli eritrociti maturi (globuli rossi di almeno tre mesi di vita), i quali, alla stregua di veri e propri "*reporter metabolici*", sono rappresentativi dello stato di organizzazione del lipidoma delle membrane cellulari dei tessuti di quell'organismo. Ne consegue che a partire dalla cellula "reporter" è possibile risalire allo stato di equilibrio omeostatico, con uno sguardo alla presenza di segnali molecolari di infiammazione, alterata fluidità e permeabilità che possono riguardare tutte le cellule ed i tessuti dell'organismo [7]. L'eritrocita maturo (il globulo rosso di almeno tre mesi di vita) rappresenta la cellula "reporter" ideale, in grado di rispecchiare in modo più che fedele lo stato di organizzazione del lipidoma delle membrane cellulari dei tessuti dell'organismo:

- l'eritrocita non è più in grado di sintetizzare proteine e lipidi (in quanto privo di nucleo), perciò la sua membrana dipende anche dagli scambi che effettua in vivo con le lipoproteine circolanti e con i tessuti,
- durata della vita: l'eritrocita ha una vita media di 120 giorni, quindi la cellula matura (di circa 90 giorni) può rispecchiare la situazione del lipidoma e quindi lo stato nutrizionale e metabolico del soggetto degli ultimi tre mesi, un periodo decisamente maggiore rispetto ai 10 giorni delle piastrine o alle poche ore della maggior parte dei leucociti,
- la sua composizione è rappresentativa dello stato generale dell'organismo e non influenzabile da cambiamenti di alimentazione a breve termine,
- gli acidi grassi presenti nella sua membrana appartengono a tutte le classi principali (SFA, MUFA, PUFA omega-6 e omega-3) e forniscono il maggior

numero di informazioni possibili, sia sullo stile di vita, sia su quello alimentare, sia sulla sintesi di mediatori importanti per il metabolismo cellulare,

- il numero di cellule: i circa 4-6 milioni/mm³ di eritrociti sono molto più rappresentativi dei tessuti rispetto alle circa 300 mila piastrine o dei 4-10 mila globuli bianchi (sempre per mm³)

Le evidenze scientifiche nell'approccio della lipidomica di membrana alla caratterizzazione del tumore, e nella ricerca di potenziali biomarkers lipidici sono fornite e riassunte in una pubblicazione del 2016 di Perotti *et al.* [4]. Inoltre, il CNR di Bologna e colleghi sottolineano queste potenzialità diagnostiche individuando il rapporto omega-6/omega-3 quale fattore di rischio oncologico tramite lipidomica eritrocitaria [8].

Fasi del lavoro

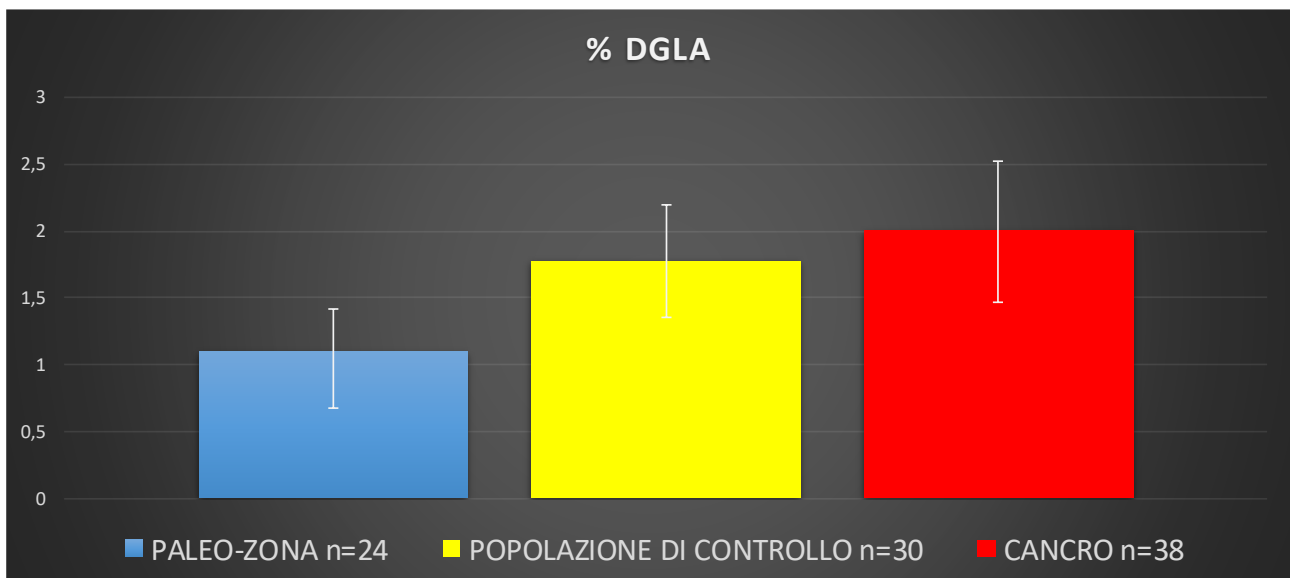
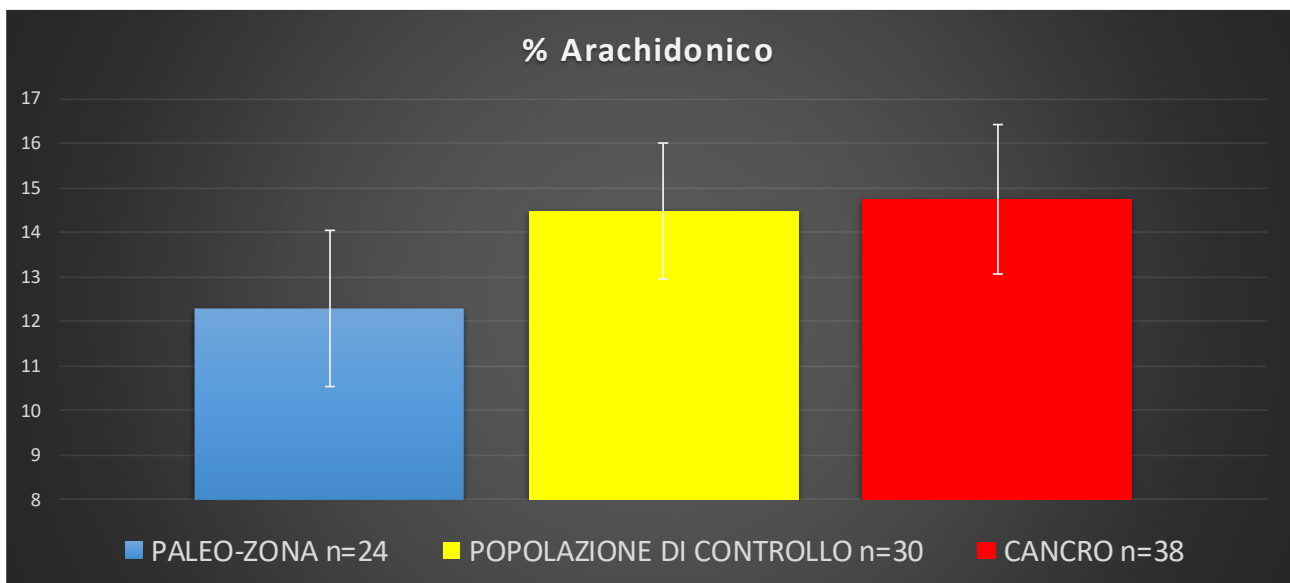
Sono state costruite tre diverse popolazioni.

- *Popolazione di controllo (healthy subject) n=30, età media 47.* Fattori di esclusione:
 - i) Segnali di Sindrome Metabolica secondo le linee guida dell'American Heart Association e il National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI) - criteri ATP III
 - ii) hs-PCR > 1 mg/L
 - iii) diagnosi di patologie pregresse
 - iv) fumatori
 - v) utilizzo di farmaci e terapie ormonali
- *Popolazione Oncologica, n=38.* Pazienti con diverse tipi di neoplasie solide, che non hanno avuto nessun percorso alimentare e nutraceutico correlato alla terapia. Nella costruzione del database viene descritta la caratterizzazione della neoplasia per ogni paziente.
- *Popolazione con alimentazione paleo-zona, n=24, età media=54.* Sono stati inseriti pazienti che effettuano una alimentazione paleo-zona da più di 6 mesi. Sono state registrate le seguenti caratteristiche (BMI, integrazione in termini di omega-3, diagnosi di patologie pregresse, valutazione di Sindrome Metabolica). Sono stati esclusi pazienti fumatori.

Ad ogni paziente è stata effettuata l'analisi di lipidomica eritrocitaria, secondo le modalità analitiche recentemente pubblicate [9].

Risultati

I risultati sono riportati in termini di % AA e % DGLA nelle tre rispettive popolazioni, correlati alla cascata omega-6. Non vengono inseriti i rapporti AA/EPA e/o omega-6/omega-3 in quanto già pubblicati recentemente nella popolazione oncologica [8].



I dati ottenuti evidenziano:

- in una dieta paleo-zona la % di AA si assesta a valori inferiori alla popolazione oncologica ($p < 0.05$) e inferiori ad una popolazione di controllo ($p < 0.05$) come determinato tramite ANOVA seguito dal Bonferroni post-hoc Test. Mentre le popolazioni cancro e controllo non sono significativamente differenti ($p > 0.05$).
- in una dieta paleo-zona la % di DGLA si assesta su valori ritenuti deficitari secondo i limiti di riferimento pubblicati ed accettati in una popolazione di controllo [7] e significativamente differenti dalla popolazione oncologica ($p < 0.05$), ma non in quella di controllo ($p > 0.05$).

I risultati vanno nella dimostrazione di come una dieta paleo-zona **possa ridurre significativamente i livelli di AA nelle membrane**, sia per un'inclusione molto basso di precursori omega-6, sia per un controllo dell'attività della delta-5 desaturasi da parte di elevate concentrazioni di EPA e bassi livelli di insulina.

Risultano in discussione i valori di DGLA. Nella pista omega-6, a partire dall'acido linolenico (LA) per azione dell'enzima delta-6-desaturasi otteniamo l'acido gamma-linolenico (GLA, 18:3). Questa reazione è molto lenta ed è ulteriormente limitata dalla mancanza di vitamine e di minerali (zinco, cobalto) e anche in condizioni di infiammazione che procurano artrite, psoriasi etc. Molto probabilmente elevate concentrazioni di omega-3 e bassi livelli di insulina o alti livelli di glucagone potrebbero limitare ancora di più l'attività enzimatica chiave della cascata omega-6. Una volta formato, il GLA viene rapidamente elongato in acido diomo-gamma-linolenico (DGLA, 20:3) e proprio grazie al DGLA esercita la sua azione antinfiammatoria.

Quest'ultimo viene rilasciato dalla membrana attraverso l'enzima Fosfolipasi A2 e diventa substrato (competendo con l'AA) per entrambi gli enzimi ciclossigenasi (COX) e lipossigenasi (LOX). Tramite l'azione della ciclossigenasi vengono prodotte prostaglandine della serie 1 (PGE1) e trombossani (TxA1), ad azione antinfiammatoria, vasodilatatoria ed antiaggregante (unico in tutta la famiglia omega-6) [10].

I valori di DGLA vanno ridiscussi in relazione ai risultati ottenuti nelle due diverse popolazioni di riferimento in modo critico, anche considerando i valori di due marker di riferimento (AA/EPA e % AA).

Bibliografia

1. TF Borin et al. **Arachidonic Acid Metabolite as a Novel Therapeutic Target in Breast Cancer Metastasis**. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, 2661
2. Gerber M. 2009. **Background review paper on total fat, fatty acid intake and cancers**. *Ann Nutr Metab*; 55(1-3):140-61.
3. Sara Huerta-Yépez et al. **Role of diets rich in omega-3 and omega-6 in the development of cancer**. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 2016;73(6):446---456
4. F. Perrotti et al. **Advances in Lipidomics for Cancer Biomarkers Discovery**. *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17, 1992
5. Leticia Gomes Lira et al. **Plasma and erythrocyte omega-3 and omega-6 fatty acids are associated with multiple inflammatory and oxidative stress biomarkers in breast cancer**. *Nutrition* 58 (2019) 194-200
6. AM Rizzo et al. **A rapid method for determining arachidonic: eicosapentaenoic acid ratios in whole blood lipids: correlation with erythrocyte membrane ratios and validation in a large Italian population of various ages and pathologies**. *Lipids in Health and Disease* 2010, 9:7
7. Carla Ferreri and Chryssostomos Chatgililoglu. **Role of fatty acid-based functional lipidomics in the development of molecular diagnostic tools**. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 12(7), 767–780 (2012)
8. Javier Amézaga et al. **Altered Red Blood Cell Membrane Fatty Acid Profile in Cancer Patients**. *Nutrients* 2018, 10, 1853
9. Alessandro Ghezzi et al. **Oxidative Stress and Erythrocyte Membrane Alterations in Children with Autism: Correlation with Clinical Features**. *PLOS ONE*. June 2013 | Volume 8 | Issue 6 |
10. Xiaoping Wang et al. **Multiple roles of dihomo- γ -linolenic acid against proliferation diseases**. *Lipids in Health and Disease* 2012, 11:25.